

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Hanna Rein

**TaqMan tehnoloogia põhine metülatsioonimustri tuvastamine enneaegselt vananeva
immuunsüsteemi monitoorimiseks**

Magistritöö
Biomeditsiini õppekava
40 EAP

Juhendaja Kai Kisand, MD, PhD
Kaasjuhendaja Lili Milani, PhD

TARTU 2016

TaqMan tehnoloogia põhine metülatsioonimustri tuvastamine enneaegselt vananeva immuunsüsteemi monitoorimiseks

Immuunsüsteem kaitseb organisme erinevate kahjustavate faktorite eest. Lisaks üldistele defektidele, mis organismi kaitsemehhanisme võivad elu jooksul pärssida, kaasnevad ka eaga olulised muutused: immuunsüsteemi võimekus väheneb ning tekib krooniline põletik. Püsivad epigeneetilised muutused immuunrakkudes võivad peegeldada immuunsüsteemi efektiivsust paremini kui kõikuv geeniekspressiooni tase. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli teha algust TaqMan tehnoloogia põhise reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi väljatöötamisega, mis võimaldaks tuvastada immuunsüsteemiga seotud geenide metülatsioonimustri muutusi, selleks et leida biomarkereid enneaegselt vananeva immuunsüsteemi monitoorimiseks. Epigeneetikal põhineva töövahendiga tõestati, et *CD3D* diferentsiaalselt metüleeritud regiooni on võimalik kasutada T-rakkude populatsiooni kvantiseerimiseks. Lisaks on võimalik tuvastada ka valitud *inflamm-aging* (vananemisega kaasnev põletikutsütokiinide kontsentratsiooni tõus veres) fenotüüpi kirjeldavate geenide (*CCL5*, *GNLY*) metülatsioonimustrit, kuid käesoleval hetkel veel east sõltuvaid järeldusi teha ei saa.

Märksõnad: immuunsüsteem, vananemine, epigeneetika, metülatsioon, qPCR

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

TaqMan technology based methylation pattern analysis to monitor premature immune system aging

The immune system protects the body from various harmful agents. Aging is often related to decreased host defenses and chronic inflammation. Stable epigenetic changes in immune cells might suit better for studying the fitness of the immune system than variation in gene expression levels. The purpose of this study was to start developing TaqMan technology based real-time polymerase chain reaction to determine the methylation patterns of immune system related genes, in order to find biomarkers for premature aging. The epigenetic tool was able to quantify T-cells by using *CD3D* differentially methylated region. It was also possible to determine the methylation pattern of genes (*CCL5*, *GNLY*) that describes the inflamm-aging (increased concentration of proinflammatory cytokines in blood) phenotype, however, the method needs improvement to make age dependent assumptions.

Keywords: immune system, aging, epigenetics, methylation, qPCR

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Immuunsüsteem ja vananemine	6
1.2. Vananemisega kaasnevad muutused kaasasündinud immuunsüsteemis	7
1.3. Vananemisega kaasnevad muutused omandatud immuunsüsteemis	8
1.3.1. B-lümfotsüüdid	9
1.3.2. T-lümfotsüüdid	10
1.3.2.1. CD4 ⁺ T-rakud	11
1.3.2.2. CD8 ⁺ T-rakud	12
1.4. Eaga kaasnevad muutused geeniekspressioonis	13
1.4.1. CD4 ⁺ ja CD8 ⁺ T-rakkude geeniekspressiooni muutused	14
1.4.2. Geeniekspressiooni regulatsioon DNA metüleerimise abil	15
1.4.2.2. DNA metülatiooni määramise kasutamine biomarkerina	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja metoodika	19
2.2.1. Valim	19
2.2.2. Metoodika	20
2.2.2.1. Markerite valik	21
2.2.2.2. Proovide bisulfit-töötlus	21
2.2.2.3. Bisulfit-töödeldud DNA preamplifikatsioon	22
2.2.2.4. qPCR preamplifitseeritud bisulfit-töödeldud DNA-le	23
2.2.2.5. Plasmiidide konstrueerimine	25
2.2.2.5.1. Plasmiidide eraldamine bakteri rakkudest	26
2.2.2.5.2. Plasmiidide lineariseerimine	26
2.2.2.5.3. Lineaarsete plasmiidide puhastamine	27
2.2.2.5.4. Lineariseeritud plasmiidide ettevalmistamine qPCR-ks	27
2.2.2.6. Andmete analüüs	28
2.3. Tulemused	29
2.3.1. Metülatioonitase <i>CD3D</i> geeni promootoralas	29
2.3.2. Metülatiooni muutused vananemisega seotud geenides	33
2.4. Arutelu	36
KOKKUVÕTE	42
SUMMARY	44
TÄNUSÕNAD	45
KASUTATUD KIRJANDUS	46
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	54
LISAD	55
Lisa 1	55
Lisa 2	56
Lisa 3	58
LIHTLITSENTS	59

KASUTATUD LÜHENDID

bp	<i>base pair</i> , aluspaar
CCL5	<i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i> , geen
CD27	<i>cluster of differentiation 27</i> , vajalik retseptor pikaajalise T-rakulise immuunsuse loomiseks ja säilitamiseks
CD28	<i>cluster of differentiation 28</i> , kostimulatoorne valk T-raku aktiveerimiseks ja ellujäämiseks
CD3	<i>cluster of differentiation 3</i> , T-rakkude koretseptor, aitab aktiveerida T-rakke
CD3D	<i>cluster of differentiation 3D</i> , T-rakkude koretseptori delta ahel
CD3E	<i>cluster of differentiation 3E</i> , T-rakkude koretseptori epsilon ahel
CD3G	<i>cluster of differentiation 3G</i> , T-rakkude koretseptori gamma ahel
CD4 ⁺	<i>cluster of differentiation 4</i> , glükoproteiin, iseloomustab T-abistaja rakke
CD40	<i>cluster of differentiation 40</i> , antigeene esitlevate rakkude kostimulatoorne valk
CD8 ⁺	<i>cluster of differentiation 4</i> , glükoproteiin, iseloomustab T-tsütotoksilisi rakke
CMV	<i>cytomegalovirus</i> , tsütomegaloviirus
CpG	5'—C— <i>phosphate</i> —G—3', CG-nukleotiidne korduvjärjestus
CRP	<i>C-reactive protein</i> , C-reaktiivne valk
C _T	<i>threshold cycle</i> , lävitsükkel
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , (läbi)voolutsütomeeter
gDNA	genoomne DNA
GNLY	<i>granulysin</i> , geen
IFN γ	<i>interferon gamma</i> , interferoon gamma
IL...	<i>interleukin</i> , interleukiin vastavalt numeratsioonile
LB	<i>lysogeny broth</i> , laboratoorne sööde bakterite kasvatamiseks
NK rakud	<i>natural killer cells</i> , loomulikud killerrakud
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , perifeerse vere mononukleaarsed rakud
qPCR	<i>real-time/quantitative polymerase chain reaction</i> , reaalaaja/kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
SD	<i>standard deviation</i> , standardhälve
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-raku retseptor
TE	Tris + EDTA, puhver
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> , transformeeriv kasvufaktor
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i> , tuumor-nekroosi faktor
TpG	5'—T— <i>phosphate</i> —G—3', TG-nukleotiidne korduvjärjestus
T _{reg}	regulatoorne T-rakk
TSS	<i>transcription start site</i> , transkriptsiooni alguspunkt

SISSEJUHATUS

Immuunsüsteem kaitseb organisme erinevate kahjustavate faktorite eest. Lisaks üldistele defektidele, mis organismi kaitsemehhanisme võivad elu jooksul pärssida, kaasnevad ka eaga olulised muutused: immuunsüsteemi võimekus väheneb ning tekib krooniline põletik. Vanusest tingitud fenotüübilisi tunnuseid (füüsiliste barjäärade kasuteguri langemine, spetsiifiliste rakkude funktsionaalse võimekuse alanemine, erinevate mediaatorite kontsentratsioonide kõikumine) on kerge tuvastada, kuid muutused toimuvad ka molekulaarsel tasemel ning nende määramine aitab spetsiifilisemalt kirjeldada eaga kaasnevaid varieeruvusi.

Molekulaarsel tasemel on võimalik uurida nii geeniekspressiooni kui ka epigeneetilisi mehhanisme. Püsivad epigeneetilised muutused immuunrakkudes võivad peegeldada immuunsüsteemi efektiivsust paremini kui kõikuv geeniekspressiooni tase. Kuna kõrget iga iseloomustab *inflamm-aging* fenotüüp (vananemisega kaasnev põletikutsütokiinide kontsentratsiooni tõus vereplasmas), siis on headeks biomarkeriteks põletikuprotsessides osalevad geenid ning neis esinevad metülatsioonimuutusi kirjeldavad regioonid.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli teha algust TaqMan tehnoloogia põhise reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi väljatöötamisega, mis võimaldaks tuvastada immuunsüsteemiga seotud geenide metülatsioonimustri muutusi selleks, et leida biomarkereid enneaegselt vananeva immuunsüsteemi monitoorimiseks.

Töö teostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudis, molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

Märksõnad: immuunsüsteem, vananemine, epigeneetika, metülatsioon, qPCR

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Immuunsüsteem ja vananemine

Immuunsüsteem on keeruline võrgustik, mis koondab erinevaid rakke, kudesid ja organeid eesmärgiga tagada organismi hea tervis ning võidelda patogeenide poolt esile kutsutud haigustega. Immuunsüsteem jaguneb kaheks: esmase kaitse moodustab kaasasündinud ehk loomulik immuunsus, mis püüab füüsiliste ja keemiliste barjääride (nahk, limaskestad, maohapped jne) ning spetsiifiliste rakkude (makrofaagid, dendriitrakud, loomulikud killer- ehk NK rakud jne) abil patogeene tõrjuda. Ebaõnnestumise korral aktiveeritakse immuunsüsteemi teine komponent ehk omandatud immuunsus, mille ühe põhiosa moodustavad valgete vererakkude hulka kuuluvad lümfotsüüdid (Goldman & Prabhakar, 1996).

Vananemine kui protsess kujutab aja jooksul organismi erinevate talitluste võimekuse langust (Troen, 2003). Kaasnev rakkude, kudede ja organite terviklikkuse vähenemine alandab võimet reageerida nii keskkonna kui ka organismi sisemistele väljakutsetele. Kujunev funktsionaalne võimetus suurendab haiguste esinemise riski, mis kokkuvõttes võib lõppeda enneaegse surmaga (Kirkwood, 2005; López-Otín *et al.*, 2013; Moskalev *et al.*, 2014; Rose *et al.*, 2012). Vananemisega seotud muutused on laiaulatuslikud ning mõjutatud on kõik koed ja neist moodustuvad organsüsteemid. Näiteks iseloomustab vanureid lihasmassi kadu ehk sarkopeenia, ülekaalulisus, luude hõrenemine ehk osteoporoos, naha elastsuse vähenemine, erinevad neurodegeneratiivsed häired ning kognitiivsete funktsioonide langus (Hunt *et al.*, 2010).

Suurimat mõju organismile avaldavad immuunfunktsioonide häired, mille tagajärjel võivad vanurid muutuda haigustele ja infektsioonidele vastuvõtlikumaks, kusjuures limiteeritud võib olla ka vaktsineerimise kaitsev efekt (Gavazzi & Krause, 2002; Goronzy & Weyand, 2013). Võrreldes noortega, esinevad eakatel sagedamini näiteks teatud tüüpi vähkkasvajad, diabeet ning kardiovaskulaarsed haigused (Kolovou *et al.*, 2014; Partridge, 2010), mille kulg võib tihti olla ka palju tõsisem (Goronzy & Weyand, 2013). Uuringute kohaselt sureb kopsupõletiku tagajärjel 2x, tuberkuloosi tagajärjel 10x ning apenditsiidi tagajärjel umbes 20x rohkem vanureid kui noori täiskasvanuid (High, 2004). Kuna nakkushaigused avaldavad tõsist mõju just vanemas eas, siis nende kindlaks tegemine ja ennetamine aitaksid kaasa tervislikule vananemisele (Boraschi *et al.*, 2013).

1.2. Vananemisega kaasnevad muutused kaasasündinud immuunsüsteemis

Vananedes langeb näiteks naha, kopsude ja seedetrakti epiteelkoe võime tõrjuda patogeenide tungimist organismi (Gomez *et al.*, 2005; Nomellini *et al.*, 2008). Kuid loomulik immuunsus koosneb lisaks füüsilistele barjääriledele ka humoraalsetest faktoritest (lüsosüüm, komplemendi valgud jne) ning erinevatest rakkudest (Goldman & Prabhakar, 1996). Täiendavalt fagotsütootilistele (neutrofiilid, monotsüüdid, makrofaagid, dendriitrakud) ja NK rakkudele, on kaasasündinud immuunsüsteemis olulised ka lahustuvad mediaatorid nagu tsütokiinid, kemokiinid, hormoonid ja/või hapniku vabad radikaalid (Weiskopf *et al.*, 2009). Eakaid inimesi iseloomustab kõrge C-reaktiivse valguga (CRP), interleukiin 6 (IL-6), IL-1 β ja tuumornekroosi faktor alfa (TNF α) plasma kontsentratsioon ja neid mediaatoreid on kirjeldatud markeritena, mille abil on võimalik ennustada funktsionaalset võimetust, nõrkust ja suremust (Bruunsgaard *et al.*, 2003; Ershler & Keller, 2000; Franceschi & Campisi, 2014; O'Mahony *et al.*, 1998).

Arvatakse, et põletikku soodustavate tsütokiinide kontsentratsiooni tõus vereplasmas aitab kaasa pidevale elukestvale immuunsüsteemi stimulatsioonile, mis põhjustab subkliinilise põletikulise staatusega – *inflamm-aging* (Franceschi *et al.*, 2000; Sansoni *et al.*, 2008). Kui noorel ja tervel indiviidil esineb üksnes lühiajaline põletikuseisund eelkõige mõne haigusega võitlemiseks, siis vanurite organismi iseloomustab pidev kerge kroonilise põletiku olemasolu, mis soodustab teatud haiguste (osteoporoos, neurodegeneratsioon jne) esinemise tõenäosust (Gao & Hong, 2008; Ginaldi *et al.*, 2005). *Inflamm-aging* võib olla tagajärg kumulatiivsele elu jooksul toimunud antigeenide aktivatsioonile, mida põhjustavad nii kliinilised kui ka subkliinilised infektsioonid ja mittenakkuslikud antigeenid (De Martinis *et al.*, 2005). Subkliinilist põletikku võib põhjustada ka degradeeritud patogeeni produktide poolt esile kutsutud kaasasündinud immuunsüsteemi pidev stimuleerimine ja/või immuunsüsteemi võimetus elimineerida teatud antigeene (Weiskopf *et al.*, 2009). *Inflamm-aging* on seotud vanurite suurenenud haigestumuse ja suremusega (Franceschi *et al.*, 2000).

Vanusega kaasnevad muutused, mis avaldavad mõju kaasasündinud immuunsüsteemi erinevatele üksustele, on kokkuvõtvalt toodud tabelis 1. Üldjuhul on tervetel vanuritel neutrofiilid veres ja nende eellased luuüdis hästi säilinud (Chatta *et al.*, 1993), ka vere monotsüütide arv vanemates inimestes ja noortes näib olevat sarnane. Ilmneb aga märkimisväärne makrofaagide ja nende eellasrakkude langus luuüdis (Plowden *et al.*, 2004). Lisaks iseloomustab vanureid suurenenud NK rakkude absoluutarv (Borrego *et al.*, 1999; Miyaji *et al.*, 2000), mis osaliselt kompenseerib NK rakkude defektset funktsionaalset

võimekust (Weiskopf *et al.*, 2009). Suurt osa eakate loomuliku immuunsuse rakke iseloomustab ka fagotsütootilise võime vähenemine, mida näitavad uuringud neutrofiilide (Wenisch *et al.*, 2000), makrofaagide (Swift *et al.*, 2001) ja dendriitrakkudega (Agrawal *et al.*, 2007).

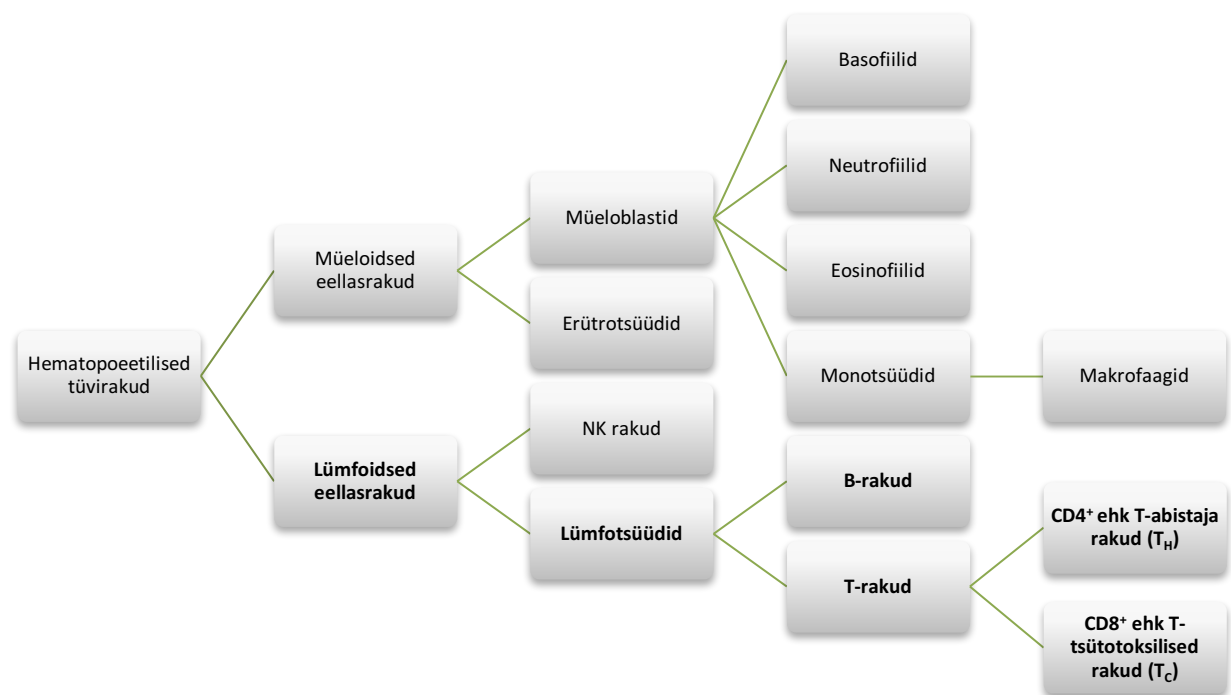
Tabel 1. Vanusega seotud muutused kaasasündinud immuunsüsteemis (Weiskopf *et al.*, 2009, kohandatud).

Raku tüüp	Vanusega seotud tõus	Vanusega seotud langus
Neutrofiilid		Oksüdatiivne purse
		Fagotsütootiline võimekus
		Bakteriotsiidne aktiivsus
Makrofaagid		Oksüdatiivne purse
		Fagotsütootiline võimekus
NK rakud	Kogu rakkude hulk	IL-2 proliferatiivne vastus
		Tsütotoksilisus
Dendriitrakud		Võime stimuleerida antigeenspetsiifilisi T-rakke
		Lümfisõlmedesse pöördumine (<i>lymph node homing</i>)
Tsütokiinid ja kemokiinid	Seerumi IL-6, IL-1 β ja TNF α tase	

1.3. Vananemisega kaasnevad muutused omandatud immuunsüsteemis

Omandatud ehk adaptiivne immuunsus on keerulisem ning spetsiifiliste rakkude tootmises, säilitamises ja transpordis osalevad tüümus, põrn, kurgumandlid, luuüdi, vereringe- ja lümfaatiline süsteem. Rakke, mis mängivad olulist rolli adaptiivses immuunsüsteemis, kutsutakse lümfotsüütideks. Viimaseid on kahte tüüpi: B-lümfotsüüdid ehk B-rakud ning T-lümfotsüüdid ehk T-rakud (Goldman & Prabhakar, 1996).

Immuunsüsteemi rakkude populatsioon uueneb pidevalt hematopoeetiliste tüvirakkude (joonis 1) arvelt, kuid eaga konkreetse koe hulk (Hartsock *et al.*, 1965) ja tüvirakkude arv luuüdis väheneb (Lansdorp *et al.*, 1994), samuti langeb nende prolifereerumisvõime (Vaziri *et al.*, 1994). Vananemine mõjutab immuunsüsteemi progresseeruvalt ning näib, et mõju omandatud immuunsüsteemile on suurem (Arnold *et al.*, 2011; Pawelec *et al.*, 2010b). Eriti olulised muutused toimuvad T-rakkudega, kuid puutumata ei jää ka humoraalne ehk B-rakkude poolt vahendatud immuunvastus (Linton & Dorshkind, 2004).



Joonis 1. Vereloome lähtuvalt luuüdis paiknevatest hematopoeetilistest tüvirakkudest. Hemaotopoeesi käigus tekivad nii müeloidsed kui ka lümfoidsed eellasrakud ja just viimastest arenevad adaptiivse immuunsüsteemi B- ja T-lümfotsüüdid (Goldman & Prabhakar, 1996).

1.3.1. B-lümfotsüüdid

Kuigi perifeersete B-rakkude hulk üldiselt vanusega ei vähene, muutub erinevate B-rakkude alatüüpide suhe. Peamiselt suureneb antigeenide poolt aktiveeritud perifeersete B-rakkude ehk mälu rakkude hulk naiivsete ehk varasemalt aktiveerimata B-rakkude arvelt (Weiskopf *et al.*, 2009). Mälu B-rakkude arvu suurenemine ning nende klonaalne kuhjumine (Weksler & Szabo, 2000) limiteerib B-lümfotsüütide repertuaari mitmekesisust, mõjutades vanurite vaktsineerimise tulemuslikkust (Gibson *et al.*, 2009). Eaga seotud muutused B-rakkude alatüüpides võivad tulla nii nende diferentseerumise ja küpsemisega seotud defektidest kui ka düsreguleeritud interaktsioonidest teiste immuunsüsteemi rakkudega (Ademokun *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 1996). Just häiritud B- ja T-rakkude omavaheline kommunikatsioon on üks põhjusi, mis takistab B-lümfotsüütide aktivatsiooni ning antikehade produktsiooni (Lazuardi *et al.*, 2005).

Aydar koos oma kolleegidega on näidanud, et vanurite follikulaarsed dendriittrakud stimuleerivad B-rakke 70% väiksema efektiivsusega kui noorte follikulaarsed dendriittrakud oma B-rakke (Aydar *et al.*, 2002). Antud olukord viitab B-rakkude funktsiooni kadumisele, mida põhjustab kahe kostimulaatorse molekuli (CD40 ja CD27) ekspressiooni vähenemine (Colonna-Romano *et al.*, 2003). Lisaks, kuigi seerumi immuunoglobuliinide tase vanuse

muutudes on stabiilne, siis antikehad, mida toodetakse vanemas eas, on madalama afiinsusega (Johnson & Cambier, 2004).

1.3.2. T-lümfotsüüdid

T-lümfotsüütide küpsemine toimub sagarikest koosnevas tüümuses, milles võib eristada koore ja säsi osa. Diferentseerumise käigus toimub migratsioon tihedalt tümotsüütide poolt asustatud kooreosast hõredalt asustatud säsi ossa, kust perifeeriasse väljuvad lõplikult küpsed naiivsed T-rakud (Weiskopf *et al.*, 2009). Vananedes tüümus taandareneb ehk toimub tüümuse involutsioon, mille käigus väheneb organi üldine suurus ning toimub funktsionaalsete osade asendumine rasvkoega (Flores *et al.*, 1999). Involutsioon saab alguse üsna varajases eas ning suurem osa protsessist on ära toimunud 40-50ndaks eluaastaks (George & Ritter, 1996), mõjutades oluliselt T-rakkude populatsiooni vananemise ajal (Henson *et al.*, 2012).

Võtmeteguriks inimese immuunsüsteemi vananemises ja funktsiooni vähenemises näibki olevat T-rakkude arvu ja funktsiooni langus (Linton & Dorshkind, 2004). Vanuses 50 on umbes 90% funktsionaalsest tüümusest juba kadunud, mis viib naiivsete T-rakkude defitsiidini perifeerses veres, lümfisõlmedes ja luuüdis (Fagnoni *et al.*, 2000; Herndler-Brandstetter *et al.*, 2012; Lazuardi *et al.*, 2005). Mälurakkude arv küll perifeerses veres ja luuüdis kasvab (Almanzar *et al.*, 2005; Herndler-Brandstetter *et al.*, 2012; Kovaïou *et al.*, 2005), kuid interaktsioonide efektiivsus antigeene esitlevate rakkude ning B-rakkudega langeb (Herndler-Brandstetter *et al.*, 2013).

Vanemate indiviidide puhul on täheldatud ka naiivsete T-rakkude funktsionaalseid defekte: märkimisväärselt lühemad telomeerid, piiratud T-rakkude retseptorite (TCR) repertuaar, langenud IL-2 produktsioon, suurenenud interferoon gamma (IFN γ) tootmine ning langenud võime diferentseeruda efektorrakkudeks (Kohler *et al.*, 2005; Pfister & Savino, 2008; Pfister *et al.*, 2006). Lisaks näib, et tüümuse taandareng mõjutab ka regulatoorseid T-rakke (T_{reg}) ning nende produktsiooni. Uuringu kohaselt hakkab T_{reg} poolt vahendatud efektor T-rakkude allasurumine pärast 50ndat eluaastat vähenema, mis võib soodustada vanusega seotud fenomene: kalduvust põletiku tekkeks ning autoimmuunsust (Tsaknaridis *et al.*, 2003).

Eaga kaasnevad üldised muutused, mis avaldavad mõju omandatud immuunsüsteemile, on kokkuvõtvalt toodud tabelis 2. Negatiivseid vanusega seotud muutusi immuunsüsteemis nimetatakse immuunosenestsentsiks ning selle tekkimisel mängivad rolli nii immuunsüsteemi keerukus kui ka geneetilised ja keskkondlikud tegurid (Weiskopf *et al.*, 2009). Üldiselt avaldubki immuunosenestsents antigeenspetsiifilise immuunsuse langusena (Weng, 2006) ning

kaasasündinud immuunsüsteemi funktsioone ja efektorrakke (makrofaagid, polünukleomorfseid leukotsüüdid, NK rakud) peetakse vähem mõjutatuks (Boraschi *et al.*, 2013).

Raku tasemel kirjeldab immuunosensitsiivset peamiselt märkimisväärne tühimuse atrofeerumisest põhjustatud naiivsete T-lümfotsüütide arvu langus (Linton & Dorshkind, 2004), B-lümfotsüütide eellasrakkude vähenemine luuüdis (Miller & Allman, 2005) ning lisaks funktsionaalselt ebakompetentsete oligoklonaalsete mälu- ja efektorrakkude kuhjumine organismis (Goronzy & Weyand, 2005). Otseseks tagajärjeks on eaga kaasnev langenud võime reageerida erinevatele antigeenidele (Baylis *et al.*, 2013), kuna TCR repertuaari mitmekesisus on vähenenud (Goronzy & Weyand, 2005).

Tabel 2. Vanusega seotud muutused omandatud immuunsüsteemis (Weiskopf *et al.*, 2009, kohandatud).

Raku tüüp	Vanusega seotud tõus	Vanusega seotud langus
T-lümfotsüüdid	Mälu- ja efektorrakkude arv	Naiivsete T-rakkude arv
	Oligoklonaalsus	T-rakkude retseptorite mitmekesisus
	Põletikku soodustavate tsütokiinide vabastamine	Kostimulaatorsete molekulide ekspressioon (CD28, CD27, CD40L). Proliferatiivne kapatsiteet
B-lümfotsüüdid	Autoreaktiivsed seerumi antikehad	B-raku prekursorite tekkimine
		Naiivsete B-rakkude arv
		B-rakkude repertuaari mitmekesisus
		Kostimulaatorsete molekulide ekspressioon (CD27, CD40)
		Antikeha afiinsus
		Isotüübi vahetus

1.3.2.1. CD4⁺ T-rakud

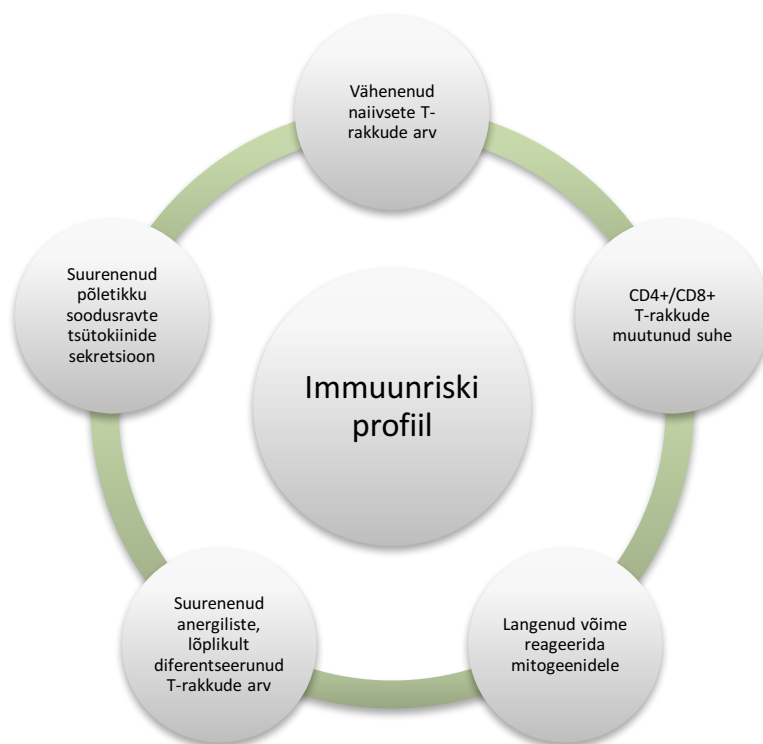
Kui noorte indiviidide veres on ülekaalus CD4⁺ T-rakud, siis vanurite organismis CD4⁺ ning CD8⁺ T-rakkude omavaheline suhe võrdsustub või kaldub CD8⁺ T-rakkude kasuks (Wikby *et al.*, 1998). Võrreldes noortest organismidest pärit naiivsete CD4⁺ T-rakkudega, näitavad vanematest isikutest või hiirtest isoleeritud naiivsed CD4⁺ T-rakud *in vitro* vähenenud tundlikkust T-raku retseptori stimulatsioonile, lisaks on muutunud tsütokiinide sekretsiooni profiil. Paralleelselt on näha ka naiivsete CD4⁺ T-rakkude abistava funktsiooni langust, mida on tarvis B-rakkudel antikehade tootmiseks (Swain *et al.*, 2005).

Vastupidiselt naiivsetele CD4⁺ T-rakkudele, on mälu CD4⁺ T-rakud pika eluaega ja suhteliselt kompetentsed sõltumata vanusest. Tervetest vanuritest ja vanadest hiirtest isoleeritud mälu rakkudes toimub normaalne *in vitro* antigeeni poolt esile kutsutud proliferatsioon (Kovaiou *et al.*, 2005). Ometigi, mälu CD4⁺ T-rakud, mida toodetakse nooremas eas, reageerivad antigeenidele paremini kui vanurites produtseeritud mälu CD4⁺ T-rakud (Haynes *et al.*, 2005). Antud leiud viitavad, et vanusega seotud defektid mälu CD4⁺ T-rakkudes võivad tuleneda defektsetest vananenud naiivsetest CD4⁺ T-rakkudest, mis ei ole võimelised korralikult prolifereruma ja millel on vähenenud mitmekesisus (Weng, 2006).

1.3.2.2. CD8⁺ T-rakud

Eaga kaasnevad muutused toimuvad ka CD8⁺ T-rakkudes ning antud T-rakkude populatsioon rikastub just lõplikult diferentseerunud efektorrakkude osas, mida iseloomustab langenud võime reageerida antigeenidele (Fülöp *et al.*, 2013). Üks märkidest, mis viitab vanusega seotud muutustele immuunsüsteemis, on CD28⁻CD8⁺ T-rakkude kuhjumine organismis (Arnold *et al.*, 2011; Pawelec *et al.*, 2010a). Antud tüüpi T-rakud puuduvad vastsündinutel ja on põhilised tsirukuleerivad CD8⁺ T-rakud 80-90%-l vanuritel (Almanzar *et al.*, 2005; Weng, 2006). Hoolimata sellest, et CD28⁻CD8⁺ T-rakkude proliferatsiooni võime on vähenenud, on nende tsütotoksilisus säilinud ja nad on resistentsed apoptoosile (Azuma *et al.*, 1993).

Vananenud organisme, kel on esinenud krooniline tsütomegaloviiruse (CMV) infektsioon, iseloomustab samuti CD28⁻CD8⁺ T-rakkude kuhjumine (Brunner *et al.*, 2011; Pawelec *et al.*, 2010a). See tähendab, et kroonilise viirusinfektsiooni esinemine potentsiaalselt kiirendab immuunsüsteemi vananemist (Almanzar *et al.*, 2005; Weng, 2006). Välja on pakutud üldist immuunriski profiili (joonis 2), mis on seotud suurenenud suremusega (Wikby *et al.*, 2008). Ka CD28⁻CD8⁺ T-rakkude esinemine on iseloomulik antud fenotübile ning korreleerub vanade inimeste gripiviiruse vastase vaksineerimise järgse antikehade produktsiooni puudumisega (Olsson *et al.*, 2000; Saurwein-Teissl *et al.*, 2002).



Joonis 2. Välja on toodud 5 põhilist immuunsüsteemi mõjutavat tunnust, mis võiksid kirjeldada enneaegse suremuse riskiga indiviide (Wikby *et al.*, 2008).

1.4. Eaga kaasnevad muutused geeniekspressioonis

Elustiili valikud (näiteks suitsetamine ja füüsiline aktiivsus) võivad kiirendada või aeglustada vananemisprotsessi (Austad, 2006; Blair *et al.*, 1989), kuid eelkõige funktsionaalsed mõjud, mis toimivad molekulaar- ja rakutasandil, annavad aluse eaga kaasnevale fenotüübile. Vananemist võivad esile kutsuda genoomi ebastabiilsus, telomeeride kulumine, epigeneetilised muutused, häiritud valkude homeoostaas, mitokondriaalsed väärtalitlused, tüvirakkude kurnatus ning muutunud rakusisene kommunikatsioon (López-Otín *et al.*, 2013).

Molekulaarseid markereid, mis võimaldaksid ennustada, jälgida ja uurida eaga kaasnevaid füsioloogilisi muutusi, on mitmeid. Kasutatud on juba näiteks leukotsüütide telomeeride pikkuse hindamist (Blasco, 2005) ja uuritud on vanusest sõltuvaid mitokondriaalse DNA deletsioone (Cortopassi *et al.*, 1992) ning T-rakkude DNA ümberkorraldusi (Zubakov *et al.*, 2010). Ometigi on kõigil nimetatud biomarkeritel suhteliselt madal täpsus ja praktikas on nad piiratud võimalustega (Meissner & Ritz-Timme, 2010). Üha populaarsemaks on aga muutunud transkriptoomi markerite abil geeniekspressiooni muutuste kirjeldamine ja selle varal vanuse ennustamine (Cao *et al.*, 2010; Harries *et al.*, 2011; Passtoors *et al.*, 2013). Väärtuslikku infot annavad geenid, mis vastutavad metaboolsete- ja DNA reparatsiooniga seotud radade funktsioneerimise eest (de Magalhães *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2005; Zahn *et al.*, 2007).

Kuid ka muutused T-rakkude transkriptsioonis on tihedalt seotud vananemisega (Cao *et al.*, 2010). Kohanemine muutuva mikrokeskkonnaga (Linton *et al.*, 2005) kutsub T-rakkude geeniekspressioonis esile olulisi muutusi, mis lõppevad kas T-rakkude funktsiooni paranemise või halvenemisega (Pawelec *et al.*, 2005; Weng, 2006). Iseloomulik on eaga kaasnev tõusnud tsütotoksilisus, suurenenud põletikutsütokiinide sekretsioon, antigeenide poolt indutseeritud proliferatsiooni ja rakujagunemise vähenemine (Chen *et al.*, 2013). Vanusest sõltuvaid muutusi T-rakkude transkriptsioonis võib näha nii tümotsüütides (Griffith *et al.*, 2012; Lustig *et al.*, 2009), perifeersetes küpsetes T-rakkudes (Remondini *et al.*, 2010) kui ka nende alatüüpides (Fann *et al.*, 2005; Mirza *et al.*, 2011).

1.4.1. CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakkude geeniekspressiooni muutused

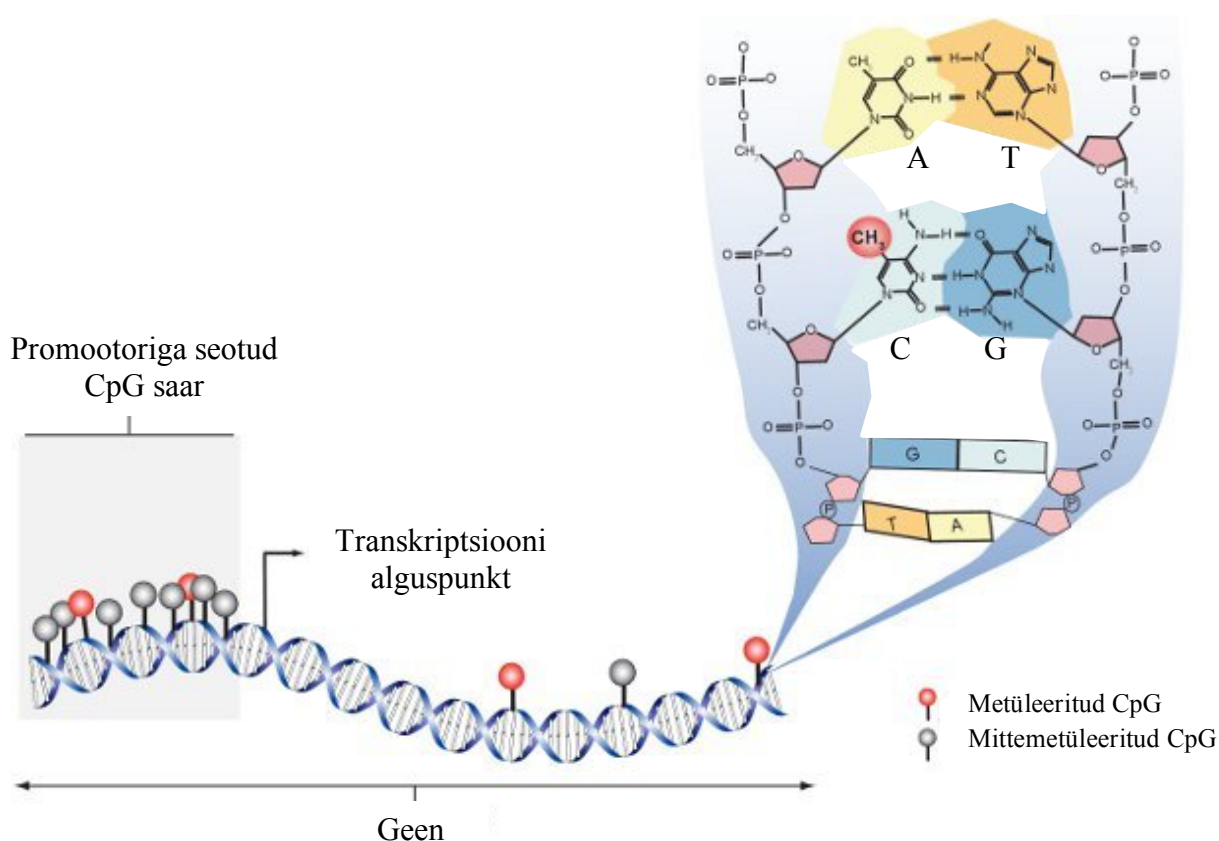
Näib, et CD4⁺ mälu T-rakkudel, nii noortel (20-30 a) kui ka vanadel (70-75 a) inimestel, on üldine geeniekspressiooni profiil sarnane (Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2008). Globaalse võrdlusanalüüsiga, milles uuriti inimese CD8⁺ T-rakkude geeniekspressiooni noortes (23-27 a) ja vanades indiviidides (65-81 a), avastati üle 700 ekspressioonimuutusega geeni (Cao *et al.*, 2010).

Vanusega muutunud geenid jagunevad 4 klassi: rakupinna retseptorid, tsütokiinid ja nende retseptorid, efektormolekulid ja transkriptsiooni regulaatorid (Weng, 2006). Vananenud lümfotsüüte iseloomustavad eelkõige muutused, mis on seotud rakupinna retseptoritega, näiteks juba mainitud koretseptori CD28 kadu (Weng, 2006). Mõjutatud on ka TCR signaali ülekanne ja seda kinnitavad uuringud nii vanade hiirte kui ka inimestega (Utsuyama *et al.*, 1993; Whisler *et al.*, 1996). TCR signaaliradadega seotud geenide ekspressiooni langust vanuse kasvades tõendab T-raku pinnal paikneva glükoproteiini CD3 gamma ahela (*CD3G*) madalam ekspressioon inimese CD8⁺ T-rakkudes (Cao *et al.*, 2010). CD3 kompleks, mis koosneb γ , δ ja ϵ ahelast, on mittekovalentselt seotud T-raku retseptoriga (Smith-Garvin *et al.*, 2009) ning seda on võimalik kasutada T-raku identifitseeriva markerina (Chetty & Gatter, 1994).

Vastupidiselt eaga kaasnevale TCR signaaliraja aktiivsuse langusele, tõuseb spetsiifiliste tsütokiinide ekspressioonitase (TNF α ja transformeeriv kasvufaktor beeta (TGF- β), teatud kemokiinid ja nende retseptorid) vanade inimeste ja hiirte CD4⁺ ning CD8⁺ T-rakkudes (Cané *et al.*, 2012; Fann *et al.*, 2005; Lazuardi *et al.*, 2009; Mo *et al.*, 2003; Yung & Mo, 2003). Enamik neist geenidest on seotud kroonilise infektsiooni tagajärjel tekkinud põletikuvastusega (Chen *et al.*, 2013).

1.4.2. Geeniekspressiooni regulatsioon DNA metüleerimise abil

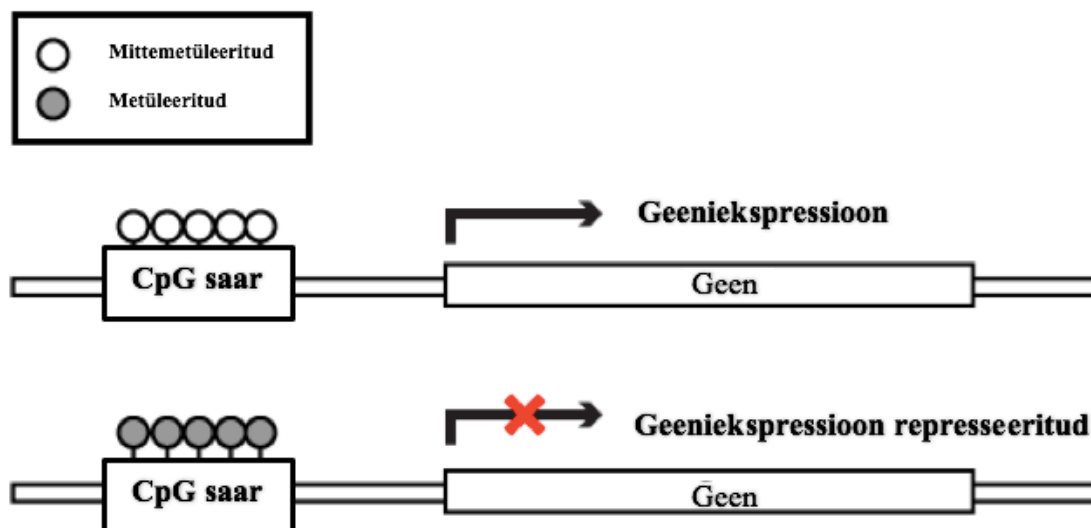
Avastatud on seoseid geeniekspressiooni mõjutavate epigeneetiliste mehhanismide ja vanuse vahel (Weidner *et al.*, 2014). Lisaks metülatsioonile kuuluvad epigeneetiliste muutuste hulka ka kromatiini remodelleerimine, histoonide posttranslatsiooniline modifitseerimine ning mittekodeerivate RNA-de nii ekspressiooni kui ka transkriptsiooni järgne modifitseerimine (D'Aquila *et al.*, 2013). Kõige enam uuritud epigeneetiline modifikatsioon inimestes on DNA primaarjärjestuse metülatsioon, mis seisneb metüülrühma ($-\text{CH}_3$) kovalentses lisamises tsütosiini 5. süsiniku külge (joonis 3; Bock *et al.*, 2006).



Joonis 3. Geeni metülatsiooni skeem. $-\text{CH}_3$ tsütosiini 5. süsiniku küljes tähistab metüleeritud C nukleotiidi. Promootriga seotud CpG saared on enamasti mittemetüleeritud, samal ajal kui geeni keskele jäävad CpG saidid on üldiselt metüleeritud (Patterson *et al.*, 2011).

Inimese DNA-s on umbes 4% tsütosiinidest metüleeritud. 5-metüültsütosiine esineb eelistatult sümmeetrilises CpG dinukleotiidses kontekstis, mis ei ole genoomis ühtlaselt jaotunud. Inimese genoomi umbes 28 miljonist CpG dinukleotiidist on ~80% metüleeritud (Breiling & Lyko, 2015; D'Aquila *et al.*, 2013). Keskmisest kõrgema CG sisaldusega piirkonnad moodustavad CpG saari, mis võivad olla umbes 1 kiloaluspaari (kbp) pikkused DNA järjestused ja neid on inimese genoomis ca 24 000-27 000. Tihti on CpG dinukleotiidid, mis asuvad CpG vaestes regioonides (intronid ja geenivälised alad), tugevalt metüleeritud, kuid CpG-d transkriptsiooni

alade alguspunktides (TSS) ning CpG saartel mittemetüleeritud (joonis 3; D'Aquila *et al.*, 2013). Viimased on seotud aktiivse transkriptsiooniga (Bird *et al.*, 1985; Stein *et al.*, 1983), samal ajal kui metüleerimine viib transkriptsioonilise inaktivatsioonini (joonis 4; Pollack *et al.*, 1980; Wigler, 1981).



Joonis 4. CpG saarte metülatsioonivariandi erinevused geeni reguletoorses piirkonnas mõjutavad geeniekspressiooni¹.

Kuna eaga DNA metülatsioonimuster muutub (Fraga & Esteller, 2007), siis seos metülatsiooni ja vananemisprotsessi vahel aitab mõista molekulaarseid mehhanisme normaalse ja enneaegse vananemise korral (Florath *et al.*, 2014). Hoolimata metülatsiooni varieerumisest erinevate kudede ja rakkude vahel, on vananemine protsess, mis mõjutab kõiki rakke ja võib olla seotud sarnaste metülatsioonimustritega paljudes inimeste kudedes: täisveri/leukotsüüdid (Bell *et al.*, 2012; Rakyan *et al.*, 2010; Teschendorff *et al.*, 2010), sülg (Bocklandt *et al.*, 2011) ja nahk (Koch & Wagner, 2011). Peamiselt iseloomustab eakate organismi genoomi globaalne (promootorregioon, eksonid, intronid jne) DNA metülatsiooni vähenemine (Heyn *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2015). Esineb ka teatud geenide promootorspetsiifilist hüpermetülatsiooni (Bell *et al.*, 2012; Christensen *et al.*, 2009; Zampieri *et al.*, 2015), kuid võrreldes eaga kaasneva hüpometülatsiooniga, on see suhteliselt harv nähtus, sest kõigest 13% metülatsiooni muutusi kirjeldavatest regioonidest on tugevalt metüleeritud (Heyn *et al.*, 2012).

On selge, et nii programmeeritud kui ka juhuslikud muutused viivad vanurite metüloomi erinevusteni, viidates kvantitatiivsele metülatsiooni mõõtmise kasulikkusele, et identifitseerida faktoreid, mis võivad kiirendada või aeglustada vananemist (Hannum *et al.*, 2013). Seega muutusi metülatsioonis võib kasutada biomarkeritena, mille abil on võimalik prognoosida ka

¹http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html

näiteks immunoloogilist vanust, kuna mõned CpG saidid näitavad tugevat korrelatsiooni vanuse ja DNA metülatsiooni vahel (Bocklandt *et al.*, 2011; Hannum *et al.*, 2013; Horvath, 2013).

1.4.2.2. DNA metülatsiooni määramise kasutamine biomarkerina

Kuna epigeneetilised muutused on püsivamad kui geeniekspressiooni kõikumised, siis näitavad hiljutised uuringud, et DNA metülatsiooni muutusi on võimalik kasutada näiteks rakupopulatsioonide kvantiseerimiseks. Metülatsioonispetsiifilise amplifikatsiooni abil on määratud T_{reg} (Sehouli *et al.*, 2011; Wieczorek *et al.*, 2009) ja üldist T-lümfotsüütide arvu (Sehouli *et al.*, 2011). Kasutatud metoodika abil kinnitati T_{reg} suurenenud sagedust ning T_{reg} ja T-rakkude omavahelise suhte tõusu vähkkasvajate korral.

Muutused metüloomis on otseselt seotud muutustega geeniekspressioonis (Sun *et al.*, 2011), kuna DNA metüleerimine kontrollib transkriptsioonilist aktiivsust transkriptsiooniks vajalike elementide juurdepääsuga (Straussman *et al.*, 2009). On selge, et eest tingitud iseärasused DNA metülatsioonis mõjutavad geeniekspressiooni ja viivad hiljem molekulaarsete ja fenotüübiliste tunnuste varieeruvuseni (Marttila *et al.*, 2015). Uuringu käigus, milles vaadeldi metüloomi seost eaga, leiti globaalse metülatsiooni profiilimise abil üle 70 000 markeri, millel on statistiliselt oluline seos metülatsioonimäärade ja vanuse vahel (Hannum *et al.*, 2013).

Perifeersetes vere leukotsüütides toimub vanusega seotud metüloomi muutusi nii $CD4^+$ kui ka $CD8^+$ T-rakkudes. Üldiselt on keskmine metülatsioonitase $CD4^+$ ja $CD8^+$ T-rakkudes nii vanadel kui noortel indiviididel suhteliselt sarnane, kuid siiski veidi enam varieerub metüloom vanurite $CD8^+$ T-rakkudes. Viimastes ekspresseeruvad teatud geenid, millel on avastatud vastupidine korrelatsioon geeniekspressiooni ja DNA metülatsiooni vahel. Seos on tugevam metülatsiooni piirkondades, mis asuvad geeni reguleerivas alas või promootorregioonis ja geenidel, mille ekspressioonitase on kõrgem (Tserel *et al.*, 2015).

Tserel ja kolleegide poolt läbiviidud uuringus tuvastati mitmeid geene, mille ekspressiooni ja metülatsiooni vahel on negatiivne korrelatsioon (hüpermetülatsiooni tagajärjel geeniekspressioon langeb ja hüpometülatsiooni tagajärjel geeniekspressioon tõuseb). Avastatud geenid mängivad olulist rolli immuunvastuses, olles vajalikud T-rakkude diferentseerumiseks ja funktsioneerimiseks. Näiteks kirjeldati langenud metülatsiooni ja tõusnud geeniekspressiooni taset vanurite $CD8^+$ T-rakkude poolt toodetud proinflammatoorsel mediaatoril *CCL5* ja granulüsiini geeni *GNLY* (Tserel *et al.*, 2015), kusjuures *CCL5* taseme tõusu eakate vereplasmas on kirjeldatud ka varem (Cao *et al.*, 2010; Zanni *et al.*, 2003).

Kemokiinid ehk kemoatraktantsed tsütokiinid reguleerivad immuunrakkude migratsiooni vereringest kudedesse ning käituvad põletikuvastuse algatajate ja säilitajatena (Ebert *et al.*, 2005). CCL5, mida produtseerivad aktiveeritud T-rakud, NK rakud ja mingil määral ka monotsüüdid (Conti *et al.*, 2001), kuulub samuti kemokiini võrgustikku ja on kemoatraktiivne T-rakkudele, monotsüütidele, NK rakkudele, basofiilidele ja eosinofiilidele (Krensky & Ahn, 2007). Antimikroobset aktiivsust omav granulüsiin (*GNLY*), mis paikneb T- ja NK rakkude tsütotoksilistes graanulites, vabastatakse antigeeni stimulatsiooni järel (Krensky, 2000).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö praktilise osa üldiseks eesmärgiks oli teha algust TaqMan tehnoloogia põhise metülatsioonispetsiifilise reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni meetodi (qPCR) väljatöötamisega. Spetsiifiliste immuunsüsteemiga seotud geenide metülatsioonimustri muutuste tuvastamine võimaldaks leida biomarkereid enneaegselt vananeva immuunsüsteemi monitoorimiseks. Sellest lähtuvalt oli antud uuringu jaoks püstitatud järgnevad eesmärgid:

- Juurutada meetod T-rakkude osakaalu hindamiseks vererakkude genoomsest DNA-st (gDNA) *CD3D* geeni diferentsiaalselt metüleeritud regiooni metülatsiooni kvantiseerimise kaudu
- Töötada välja meetod kahe vananemise ja põletikuga seotud regiooni metülatsioonitaseme hindamiseks

Eesmärkide saavutamiseks püstitati järgmised tööülesanded:

- Valida välja spetsiifilised diferentsiaalselt metüleeritud geenid ning neis paiknevad CpG saidid
- Disainida sihtmärkregioonidesse *forward* ja *reverse* praimerid ning TaqMan sondid
- Disainida preamplifikatsiooniks vajalikud *forward* ja *reverse* praimerid
- Konstrueerida molekulide koopiaarvu kvantiseerimiseks spetsiifilised plasmiidid ning testida TaqMan süsteemi spetsiifilisust
- Luua konstrueeritud plasmiididest lahjendusrida
- Viia läbi metülatsioonispetsiifiline qPCR ja analüüsida saadud andmeid

2.2. Materjal ja metoodika

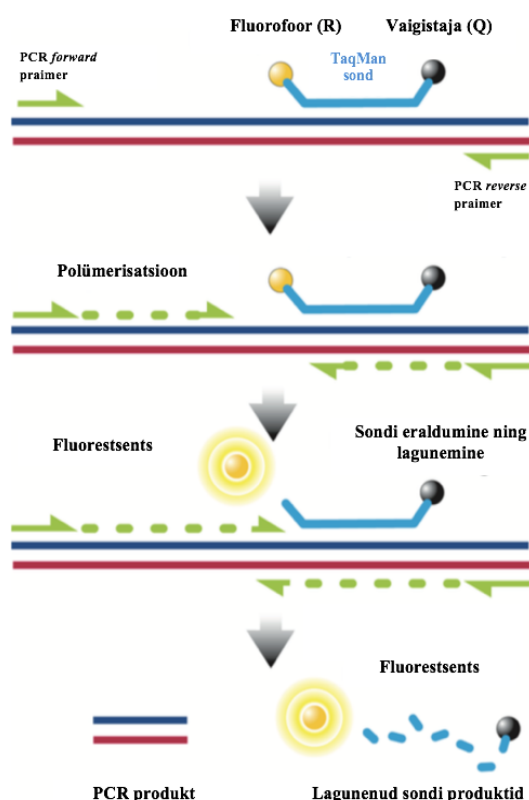
2.2.1. Valim

Antud töös uuriti TÜ Eesti Geenivaramu geenidoonoreid, kelle täisvere gDNA-d eksperimentide läbiviimiseks kasutati. 50 noort (vanuses 22-34 eluaastat) ja 50 vanurit (vanuses 73-84 eluaastat) indiviidi olid välja valitud varasema projekti raames (Tserel *et al.*, 2015) ning nende seas oli 51 naist ja 49 meest. Materjalist sõltuvate tulemuste varieeruvuse kirjeldamiseks viidi katseid läbi ka 4 erineva indiviidi (3 naist ja 1 mees) täisverest eraldatud perifeersete mononukleaarsete rakkude (PBMC) gDNA-ga. Rakkude isoleerimise ning gDNA eraldamise teostas molekulaarpatoloogia uurimisgrupi spetsialist.

Töös sooritatud uuringute teostamiseks on geenidoonorid andnud informeeritud nõusoleku ning on olemas Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee luba.

2.2.2. Metoodika

Meetod baseerub TaqMan tehnoloogia põhisel qPCR-l. Fluorogeenselt märgistatud spetsiifilise sondi eemaldumine sihtmärkjärjestuselt ning reportervärvi eraldumine sondist võimaldavad qPCR-i masinal tuvastada signaali ja seeläbi reaajas tekkinud produkti akumulereerumist jälgida² (joonis 5).



Joonis 5. TaqMan sondi põhine qPCR mehhanism. Fluorestsents reportervärv (R) ja vaigistaja (Q) on kinnitunud vastavalt TaqMan sondi 5' ja 3' otsa. Kui sond on seotud sihtmärkregiooniga, siis värvi kiirgumine on vaigistatud. Iga polümerisatsioonitsükli vältel eemaldab DNA polümeraas oma nukleaase aktiivsusega sondi ning lagundab selle. Kui reporter on vaigistaja küljest eraldunud, hakkab kiirguma iseloomulikku fluorestsentsvalgust, mille hulka detekteeritakse reaajas^{2,3} (kohandatud). Käesolevas töös kasutati FAM-TAMRA fluorestsentsmärgist.

²<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>

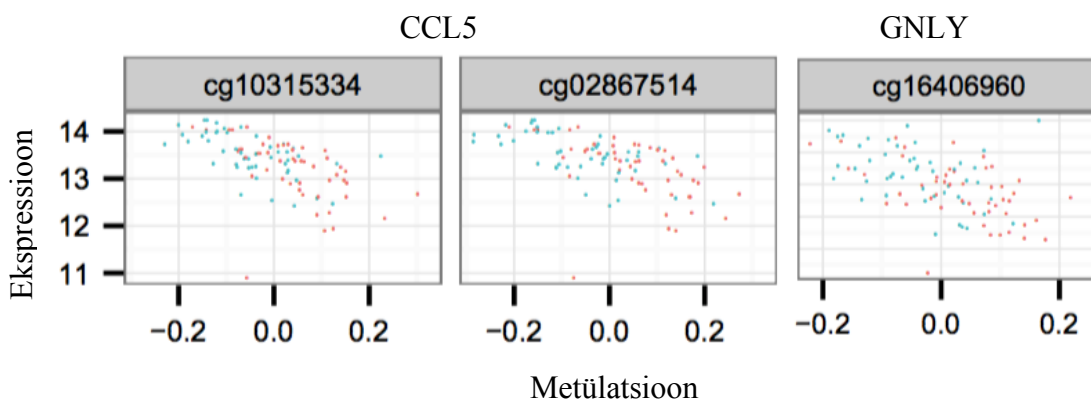
³https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf

Käesolevas töös püütakse TaqMan qPCR-i süsteemi rakendada metülatsiooni tuvastamiseks ja selleks kasutatakse spetsiifilisi praimereid ning sonde, mis võimaldaksid tuvastada metülatsioonimuutusi valitud regioonides.

2.2.2.1. Markerite valik

T-rakkude osakaalu hindamine perifeersest verest toimus *CD3D* geeni promootorala diferentsiaalselt metüleeritud regiooni järgi. Varasemate andmete põhjal on selgunud, et *CD3* geenide promootor ja regulaatoralade metülatsioon $CD4^+$ ja $CD8^+$ T-rakkudes avaldub peale DNA bisulfit-töötlust TpG variandina (kirjeldus alapeatükis 2.2.2.2.), kuid granulotsüütides, monotsüütides, NK rakkudes ja B-lümfotsüütides CpG variandina (Sehouli *et al.*, 2011).

Teised metülatsiooni muutuste määramiseks valitud geenid ning neis paiknevad spetsiifilised CpG saidid baseeruvad Tserel ja kolleegide poolt läbi viidud uurimusel, kus nende erinev metülatsioonimuster korreleerus geenide ekspressioonitasemega $CD8^+$ T-rakkudes (joonis 6; Tserel *et al.*, 2015). Nimetatud töös kasutati metülatsioonimustri tuvastamiseks Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina) kiipi. Välja valitud markergeenid on seotud põletikuliste protsessidega, mis peaksid edukalt kirjeldama vanurite *inflamm-aging* fenotüüpi. Konkreetsed CpG saidid lähtuvad töös kirjeldatud β -väärtustest, mis näitasid olulisi erinevusi noorte ja vanade vahel.



Joonis 6. $CD8^+$ T-rakkude *CCL5* geenis paiknevad cg10315334 ja cg02867514 ning *GNLY* geenis paiknev cg16406960 omavad negatiivset korrelatsiooni geeniekspressiooni ja metülatsiooni vahel. Y-teljel on toodud ekspressioonitase ning x-teljel metülatsiooni muutus, sinised ja punased täpid tähistavad vastavalt vanemaid ning nooremaid indiviide. Hajuvusgraafikud näitavad geenide *CCL5* ja *GNLY* kõrgemat ekspressiooni vanematel inimestel, kuna metülatsioonitase on langenud (Tserel *et al.*, 2015, kohandatud).

2.2.2.2. Proovide bisulfit-töötlus

DNA metülatsiooni tuvastamiseks kasutati tänapäeval enim levinud meetodit bisulfit-töötlust (Frommer *et al.*, 1992). Genoomse DNA bisulfit-töötluse korral konverteeritakse

mittemetüleeritud C nukleotiid ja CpG dinukleotiidid kas U nukleotiidiks või UpG dinukleotiidiks, mis järgneva amplifikatsiooni käigus vastavad kas T nukleotiidile või TpG dinukleotiidile (TpG variant). Metüleeritud CpG dinukleotiid säilitab oma kuju CpG variandina. Joonisel 7 on toodud näide bisulfit-töötuse toimest (Olek *et al.*, 1996).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Algne DNA	5'	A	T	C	A	C*	G	C	G	C*	G	C	G	3'
DNA järjestus pärast bisulfit-töötuse amplifikatsiooni	5'	A	T	T	A	C	G	T	G	C	G	T	G	3'

Joonis 7. DNA järjestus enne ja pärast bisulfit-töötust. Algse DNA metüleeritud CG dinukleotiidid (#5 ja #9) säilitavad pärast bisulfit-töötust oma CpG variandi. Metüleerimata C-d positsioonides #3, #7 ja 11# konverteeritakse nukleotiidiks U ning järgneva amplifikatsiooni käigus detekteeritakse neid tümiinina (T).

Bisulfit-töötus viidi läbi *EZ DNA Methylation™ Kit*'iga (Zymo Research, USA) vastavalt tootja protokollile. Töötlusesse võeti 600 ng gDNA-d, lisati 5 µl *M-Dilution* puhvrit ja reaktsioonimaht viidi deioniseeritud veega 50 µl-ni. Pipetiga segatud proove inkubeeriti +37 °C juures 15 minutit. Järgnevalt lisati 100 µl valgustundlikku *CT Conversion* reagenti, milles sisalduv naatriumbisulfit reageerib tsütosiiniga. Proove inkubeeriti üleöö termotsükleris Eppendorf Mastercycler (Applied Biosystems), režiimil:

95 °C	30 sek	} 16 tsüklit
50 °C	1 h	
4 °C	∞	

Inkubeeritud proovid kanti *Zymo-Spin™ IC* kolonnidele, millele oli eelnevalt lisatud 400 µl *M-Binding* puhvrit. Kolonnid tõsteti kogumistuubi ja proove segati paar korda kolonne tagurpidi pöörates. Järgnes proovide tsentrifuugimine täiskiirusel ($\geq 10\,000 \times g$) 30 sekundit (Centrifuge 5415 D, rootor F45-24-11, Eppendorf). Pärast läbijooksu äraviskamist kanti kolonnile 100 µl *M-Wash* puhvrit ning tsentrifuugiti taas 30 sekundit täiskiirusel. Seejärel töödeldi proove 200 µl *M-Desulphonation* puhvriga, inkubeerides neid toatemperatuuril 15 minutit, pärast mida pesti kolonne kahel korral 200 µl *M-Wash* puhvriga. Proovide elueerimiseks asetati kolonnid 1,5 ml tuubidesse ning lisati 50 µl deioniseeritud vett. Pärast 30 sekundilist täiskiirusel tsentrifuugimist oli saaduseks bisulfit-töödeldud DNA kontsentratsiooniga ~12 ng/µl.

2.2.2.3. Bisulfit-töödeldud DNA preamplifikatsioon

Vähendamaks qPCR-i jaoks vajamineva DNA mahtu, viidi läbi sellele eelnev bisulfit-töödeldud DNA preamplifikatsioon, milleks vajalikud praimerid disainiti lähtudes eeldustest:

- Praimerite optimaalne pikkus vahemikus 18-25 bp
- Praimerite optimaalne sulamistemperatuur 54-60 °C
- Amplikoni optimaalne pikkus 200-500 bp
- Amplikoni sisaldab qPCR-i poolt üles amplifitseeritavat piirkonda
- Praimerid ei tohi sisaldada metülatsoonimustri muutusi kirjeldavaid regioone

Saadi järgnevad praimerite paarid:

GEEN	<i>forward 5'→3'</i>	<i>reverse 5'→3'</i>
<i>CCL5</i>	GGTTGTGGTGGTTAAGATTAGG	AAATACCCCTCAACTAACCCCTATA
<i>GNLY</i>	AAAGGGAATTATTAGGTAATTAGGG	CCCACTCCCACACAATA
<i>CD3</i>	GAATTATTAGTTTGGGTGAGAGTTG	AATCCTAAAAAAATCAACCTCCAT

Ühe PCR reaktsioonisegu kogumahuks oli 25 µl, mis sisaldas:

	Maht	Kontsentratsioon
10x Yellow PCR Buffer (Naxo, Eesti)	2,5 µl	1x
25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne, Eesti)	1,5 µl	1,5 mM
2 mM dNTP (Solis BioDyne, Eesti)	1,5 µl	0,12 mM
5 U/µl HOT FirePol DNA polümeraas (Solis BioDyne, Eesti)	0,3 µl	1,5 U
5 µM F+R praimerisegu (Metabion International AG, Saksamaa)	1 µl	0,2 µM
Deioniseeritud vesi	17,2 µl	N/A
Bisulfit-töödeldud DNA	1 µl	~12 ng/µl

Preamplifikatsiooniks vajalik PCR viidi läbi termotsükleris Eppendorf Mastercycler, režiimil:

Polümeraasi aktivatsioon	95 °C 15 min	
Denaturatsioon	95 °C 20 sek	} 25 tsüklit
Praimerite seondumine	56 °C 30 sek	
Produkti paljundamine	72 °C 1 min	
Lõpp elongatsioon	72 °C 3 min	
	4 °C ∞	

2.2.2.4. qPCR preamplifitseeritud bisulfit-töödeldud DNA-le

Selleks, et tuvastada, milline metülatsooni variant (TpG või CpG) antud indiviidil valitud geeni regioonis domineerib, tuli läbi viia TaqMan tehnoloogia põhine qPCR. Metülatsooni hindamiseks disainiti samale regioonile kaks erinevat sondi ning kaks paari *forward* ja *reverse* praimeereid, mis seonduksid vastavalt kas TpG või CpG varianti sisaldava järjestusega. Oluline

oli tagada võimalikult kõrge spetsiifilisus, seega lähtuti praimerite ning sondi loomisel järgmistest eeldustest⁴ (kohandatud):

- Metülatsioonimuutusi kirjeldav TpG/CpG sait peab võimalusel paiknema praimerite (te) 3' otsas
- Võimaluse korral sisaldab iga praimer/sond vähemalt ühte TpG/CpG dinukleotiidi
- Praimerite optimaalne pikkus vahemikus 18-25 bp
- Praimerite optimaalne sulamistemperatuur 54-60 °C
- Sondi optimaalne sulamistemperatuur ~10 °C kõrgem
- Amplikoni optimaalne pikkus 100-150 bp

Saadi järgnevad praimerid ja sondid:

CCL5		
TpG	<i>forward 5'→3'</i>	GGGAGGTAGATGTAGGAGTG
	<i>reverse 5'→3'</i>	AATCAAAACAACACATAAACCTCA
	<i>sond 5'→3'</i>	ATGATAGTGAGGGTTGTTGTGGAGATTT
CpG	<i>forward 5'→3'</i>	GGAGGTAGATGTAGGAGCG
	<i>reverse 5'→3'</i>	CAAAACAACACGTAAACCTCG
	<i>sond 5'→3'</i>	ATAGCGAGGGTTGTCGCGGAGAT
GNLY		
TpG	<i>forward 5'→3'</i>	GGGTTAAGTGAGATGATTTATT
	<i>reverse 5'→3'</i>	TACCAAAATACCTAAAATATACCA
	<i>sond 5'→3'</i>	TGTTTTATGTAATATTTGGAATGTATTTGTATTAAG
CpG	<i>forward 5'→3'</i>	GGGTTAAGTGAGATGATTTATTTA
	<i>reverse 5'→3'</i>	TACCAAAATACCTAAAATATACCG
	<i>sond 5'→3'</i>	TGTTTTATGTAATATTTGGAACGTATTTGTATTAAG
CD3 (Sehouli <i>et al.</i> , 2011, modifitseeritud)		
TpG	<i>forward 5'→3'</i>	GGTGGTTTGAATTTTAGTGT
	<i>reverse 5'→3'</i>	AAAAATCTAACTACTACAACCTAC
	<i>probe 5'→3'</i>	GAGAAGTTGTTGGTTTTATAGTGTAAG
CpG	<i>forward 5'→3'</i>	GTGGTTTGAATTTTAGCGT
	<i>reverse 5'→3'</i>	AAATCTAACTACTACGACTTAC
	<i>sond 5'→3'</i>	TCGTCGGTTTTATAGCGT

⁴ <http://www.epibeat.com/tools-technology/bisulfite-conversion-and-methylation-sequencing/2131/>

qPCR reaktsioonid segati kokku triplikaatidena, mahuks 33,4 µl, mis sisaldas järgnevaid komponente:

	Maht	Kontsentratsioon
5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) (HOT FIREPol® DNA polümeraas, 5x probe qPCR puhver, 15 mM MgCl ₂ , dNTPs, ROX värv) (Solis BioDyne, Eesti)	6,68 µl	1x
5 µM F+R praimerisegu (Metabion International AG, Saksamaa)	10,02 µl	1,5 µM
5 µM TaqMan sond (Metabion International AG, Saksamaa)	1,67 µl	0,25 µM
Deioniseeritud vesi	12,03 µl	N/A
Preamplitseeritud bisulfit-töödeldud DNA	3 µl	N/A

Saadud segu tõsteti 10 µl kaupa kolmes korduses qPCR 384-kannulisele mikrotiiterplaadile laiali ning amplifikatsioon viidi läbi masinaga ViiA™ 7 (Applied Biosystems), režiimil:

Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	} 45 tsüklit
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60 °C	1 min	

2.2.2.5. Plasmiidide konstrueerimine

TpG või CpG motiivi koopiaarvu kvantiseerimiseks konstrueeriti plasmiidid. Kloneerimisvektorina kasutati pUC57-Amp (lisa 1), mis sisaldas kas *CCL5*, *GNLY* või *CD3* TpG/CpG amplikoni. GENEWIZ'st (Euroopa) tellitud lüofiliseeritud plasmiidid lahustati üles 20 µl Tris+EDTA (TE) puhvriga, saades lõppkontsentratsiooniks 0,2 µg/µl. Plasmiidid transformeeriti *Escherichia coli* (*E. coli*) rakkudes: 2 µl-le plasmiidilahusele lisati 30 µl kompetentseid baktereid, proove segati ning inkubeeriti 30 minutit jääl. Järgnes kuumašokk 3 minutit +37 °C juures, pärast mida asetati rakud uuesti paariks minutiks jääle. Rakke kosutati 1 ml laboratoorses söötmes (LB) ning inkubeeriti +37 °C juures 45 minutit. Saadud transformeerimisegu tsentrifuugiti 3 minutit 6000 x g juures, seejärel eemaldati ~970 µl supernatanti. Järele jäänud rakususpensioon kanti ampitsilliini sisaldavale agarsöötmele. Petri tasse inkubeeriti üleöö +37 °C juures. Järgneval päeval võeti külviaasaga 5-6 üksikkolooniat, mis viidi pooleliitrises kolvis olevasse 100 ml LB vedelsöötmesse, kuhu lisati ka 100 µl karbenitsilliini (50 µg/µl). Bakterikultuuri kasvatati 18 h loksutil +37 °C keskkonnas. Järgmisena tsentrifuugiti suspensiooni 20 minutit pöõretel 4500 x g (Sorvall RC-5B Plus Superspeed Centrifuge; rootor AF6.250, Kendro) ning eemaldati supernatant.

2.2.2.5.1. Plasmiidide eraldamine bakteri rakkudest

E. coli rakkudes kasvatatud plasmidide eraldamiseks kasutati *Endotoxin-free plasmid DNA purification kit*'i (Macherey-Nagel, Saksamaa). Kõrge koopiaarvuga plasmidide puhastamine baseerus *NucleoBond® Xtra EF plasmid purification midi* protokollil. Alustuseks resuspendeeriti rakke 8 ml *RES-EF + RNase A* puhvris, seni kuni sade oli täielikult lahustunud. Rakkude lüüsimiseks lisati 8 ml *LYS-EF* puhvrit, topse segati 5-6x ümber pöörates ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Järgnes lüsaadi neutraliseerimine 8 ml *NEU-EF* puhvri lisamisel ning topse keerati üle korgi seni kuni lüüsipuhvri indikaatorvärv hajus. Lüsaati hoiti jääl (minimaalselt 5 minutit) ja samal ajal toimus kolonnide tasakaalustamine. Selleks kanti 15 ml *EQU-EF* puhvrit ringjalt *NucleoBond® Xtra* kolonnidele, nii et kogu filter saaks niisutatud. Lüsaat (suuremad tükid peenestati külviaasaga) kanti kolonnidele kohe kui kogu tasakaalustamiseks kasutatud puhver oli läbi jooksnud.

Esimese pesu jaoks kanti filtrile ringjalt 5 ml *FIL-EF* puhvrit, et eemaldada kogu sinna kinnitunud lüsaat. Läbijooksu järel filter eemaldati. Teise pesu jaoks kanti kolonnile 35 ml *ENDO-EF* puhvrit ning pärast läbijooksu toimumist järgnes kolmas pesu, mil kolonnile lisati 15 ml *WASH-EF* puhvrit. Pärast pesu elueeriti plasmidset DNA-d 5 ml *ELU-EF* puhvriga, mis koguti 15 ml tuubidesse. Plasmidne DNA sadestati 3,5 ml toatemperatuuril oleva isopropanooliga, segati tugevalt loksutades ning tsentrifuugiti (Eppendorf 5810R Centrifuge, rootor A-4-62) 1 h täispööretel (4000 x g) 18 °C juures. Supernatant valati ära ning sadet pesti 3 ml 70% etanooliga. Pärast 10 minutilist täispööretel tsentrifuugimist eemaldati ettevaatlikult lisatud etanool ning lasti kuivada. Sade lahustati 500 µl *H2O-EF* puhvriga. DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit (Thermo Scientific).

2.2.2.5.2. Plasmiidide lineariseerimine

Kvantiseerimiseks oli oluline, et qPCR abil amplifitseeritakse lineaarseid plasmide. Selle jaoks restrikteeriti puhastatud plasmide ensüümiga ScaI. Restriksioon toimus 1 h jooksul +37 °C juures. Restriksioonisegu lõppmaht oli 30 µl ning koosnes see järgnevatest komponentidest:

	Maht	Kontsentratsioon
10x puhver ScaI (Thermo Fisher Scientific, USA)	3 µl	1x
Ensüüm ScaI 10 U/µl (Thermo Fisher Scientific, USA)	1 µl	10 U
Plasmidne DNA	...	1 µg
Deioniseeritud vesi	Lõppmahuni	N/A

2.2.2.5.3. Lineaarsete plasmiidide puhastamine

Lineariseeritud plasmiidide puhastamiseks kasutati *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit*'i (Thermo Scientific, USA) ning protsess teostati tootja protokoll järgides. Puhastamine toimus toatemperatuuril ning kõigepealt viidi restriksioonisegu maht 200 µl-ni, selleks lisati ensümaatilisele segule 170 µl deioniseeritud vett. Järgnevalt lisati 100 µl sidumispuhvrit (*Binding Buffer*), segati korralikult pipetiga läbi ning lisati 300 µl 96% etanooli ja segati proov homogeenseks. Saadud segu kanti kogumistuubides asuvatele *DNA purification Micro* kolonnidele, mida tsentrifuugiti 1 minut 14 000 x g juures (Centrifuge 5415D, rootor F45-24-11, Eppendorf), läbijooks eemaldati. Pesuks lisati 700 µl *Wash Buffer*'t ning tsentrifuugiti taas samadel parameetritel, läbijooks eemaldati. Nimetatud pesu tehti kaks korda ja seejärel tsentrifuugiti tühjasid kolonne veel 1 minut 14 000 x g juures, et eemaldada viimased puhvrijäägid. Kolonnid tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning plasmiidid elueeriti 10 µl elueerimispuhvriga (*Elution Buffer*). Pärast 1 minutilist tsentrifuugimist saadud lineaarseid plasmiide säilitati -20 °C juures.

2.2.2.5.4. Lineariseeritud plasmiidide ettevalmistamine qPCR-ks

Reaalaja PCR-ks vajalike plasmiidide ettevalmistamine teostati protokoll järgi. Eelnevalt spektrofotomeetriga mõõdetud lineaarsete plasmiidide kontsentratsioonid ($\frac{ng}{\mu l}$) teisendati ühikutesse grammi liitri kohta ($\frac{g}{L}$). Seejärel arvutati plasmiidide molekulaarmass (F.W.) valemiga $F.W. = \text{plasmiidi suurus (bp)} \times 662 \text{ grammi molekuli aluspaari kohta } (\frac{g}{mol \cdot bp})$. Antud katses oli plasmiidi pUC57-Amp suurus 2710 bp. Lineariseeritud plasmiidide molaarne kontsentratsioon arvutati valemi $M(\frac{mol}{L}) = \frac{mass(g)}{F.W.} : 1L$ abil. Leiti lineariseeritud plasmiidide koopiaarv 1 µl kohta, teades, et 1 M on võrdne umbes $6,0221415 \times 10^{23}$ koopiaga, seega korrutati saadud molaarne kontsentratsioon Avogadro arvuga ning teisendati mikrolitritesse.

Järgnev protseduur toimus tõmbekapi all, kuna reaalaja PCR on väga tundlik igasugusele saastumisele. Lahjendusrea tegemist alustati kontsentratsioonist 2×10^9 plasmiidikoopiat mikrolitri kohta (C_f), lõppmahuks 20 µl (V_f). Kasutades $C_i V_i = C_f V_f$ seost, kus V_i on teadmata plasmiidistocki maht, mida tuleb kasutada lahenduse tegemiseks, C_i on lineaarse plasmiidistocki algne kontsentratsioon (koopiat/µl). Esimese lahenduse tegemiseks võeti $V_i = \frac{C_f \cdot V_f}{C_i}$ plasmiidistocki ja lisati ülejäänud hulgas Tris + EDTA (TE) puhvrit, mis sisaldas 2 ng/µl *Salmon sperm* DNA-d. Järgnes 10x lahjendusrea tegemine, mille kangeim kontsentratsioon oli 10^9 koopiat/µl, lõppmahuks 50 µl. Lahjendamiseks kasutati samuti TE+*Salmon sperm* DNA

segu. Lahjendusseeria tegemiseks kasutati DNA *LoBind* tuube, mis takistavad DNA-l seonduda tuubi seinale ja vähendavad sellega kontsentratsiooni langemise ohtu. Lahjendatud plasmiidirida säilitati temperatuuril -20 °C.

2.2.2.6. Andmete analüüs

Reaalaja PCR-i tulemusi analüüsiti kõigepealt ViiA™ 7 tarkvara abil. Standardkõvera kalde (*slope*) väärtus -3,3 tähistab optimaalset, 100%-list qPCR-i amplifikatsiooni efektiivsust. Proove, mille vähemalt kahe korduse keskmise lävitsükli (C_T) standardhälve (SD) oli >0,2 (Karlen *et al.*, 2007), edaspidi andmeanalüüsidesse ei kaasatud. Saadud andmed korrastati programmiga MS Office Microsoft Excel 2010.

Lähtuvalt plasmiidse lahjendusrea C_T väärtuste tulemuste alusel tuvastatud TpG ja CpG molekulide koopiaarvudest leiti iga indiviidi spetsiifilise geeni TpG molekulide suhteline sagedus ($\frac{TpG}{TpG+CpG}$) %. Selleks, et hinnata kasutatud materjalist, vanusest ning soost sõltuvaid varieeruvusi, sooritati kahepoolne paaritu t-test. Korrelatsiooni uuringute jaoks kasutati lineaarset ehk Pearsoni korrelatsioonikordajat. Oluliseks loeti tulemusi, mille p-väärtus oli <0,05. Statistiline analüüs ning graafikud konstrueeriti tarkvara GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, USA) abil.

T-rakkude osakaalu hindamiseks lähtuvalt spetsiifilisest CD3 markerist sooritati 4 korduskatset kahe erineval ajahetkel läbiviidud preamplifikatsiooni ja bisulfit-töötusega. Variatsioonikordaja ehk suhteline viga (C_V) arvutati valemiga $C_V(\%) = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100$, kus σ on nelja qPCR amplifikatsiooni signaali tuvastamise hetkel saavutatud C_T väärtuste standardhälve ja μ on nelja qPCR amplifikatsiooni signaali tuvastamise hetkel saavutatud C_T väärtuste keskmine.

2.3. Tulemused

2.3.1. Metülatsoonitase *CD3D* geeni promootoralas

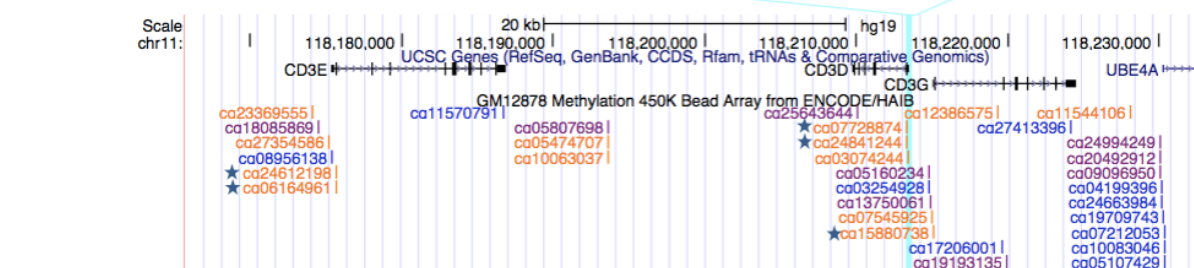
Läbiviidud eksperimendis kasutatud praimerite paiknemine ning CpG saidid on visualiseeritud joonisel 8.

chr11:118213363-118213735 TpG motiiv

5'GAATTATTAGTTGGGTGAGAGTTGTTTTTTTAGTTGATTATAGGTATGGAAGAGGAGAGTGGGGGAGGAATTAGAAGA
TGTTTGTTTTTTTGTGTTTGTGTTGATGGTGGGAAATTTTAGAGTGGGGGTGGGTAGGGGTAGGGTAGGAAGGAAGTGGTGT
AAATTGTTTTATTTTGTAGTAGGGAGTTGGTAGAGAATATGGAAAAGGTGGTTTGAATTTTAGTGTTTTATTGATAATGTAATTA
TATTTATATATAATTAAATATTGTTATATTTGAAGTTTTTGAAGAGAAGTGTGTTGTTTATAGTGTAAAGTTGTAGTAGTTAGAT
TTTTATGGAGGTTGATTTTTTTTAGGATT3'

chr11:118213363-118213735 CpG motiiv

5'GAATTATTAGTTGGGTGAGAGTTGTTTTTTTAGTTGATTATAGGTATCGGAAGAGGAGAGTGGGGGAGGAATTAGAAGA
TGTTTGTTTTTTTGTGTTTGTGTTGATGGTGGGAAATTTTAGAGTGGGGGTGGGTAGGGGTAGGGTAGGAAGGAAGCGGTGT
AAATTGTTTTATTTTGTAGTAGGGAGTTGGTAGAGAATATGGAAAAGGTGGTTTGAATTTTAGCGTTTTTATTGATAATGTAATTA
TATTTATATATAATTAAATATTGTTATATTTGAAGTTTTTGAAGAGAAGTCGTCCGTTTATAGCGTAAGTCGTAGTAGTTAGAT
TTTTATGGAGGTTGATTTTTTTTAGGATT3'



Preamplifikatsiooni praimerid (373 bp)

qPCR produktid: TpG motiiv 131 bp ja CpG motiiv 128 bp

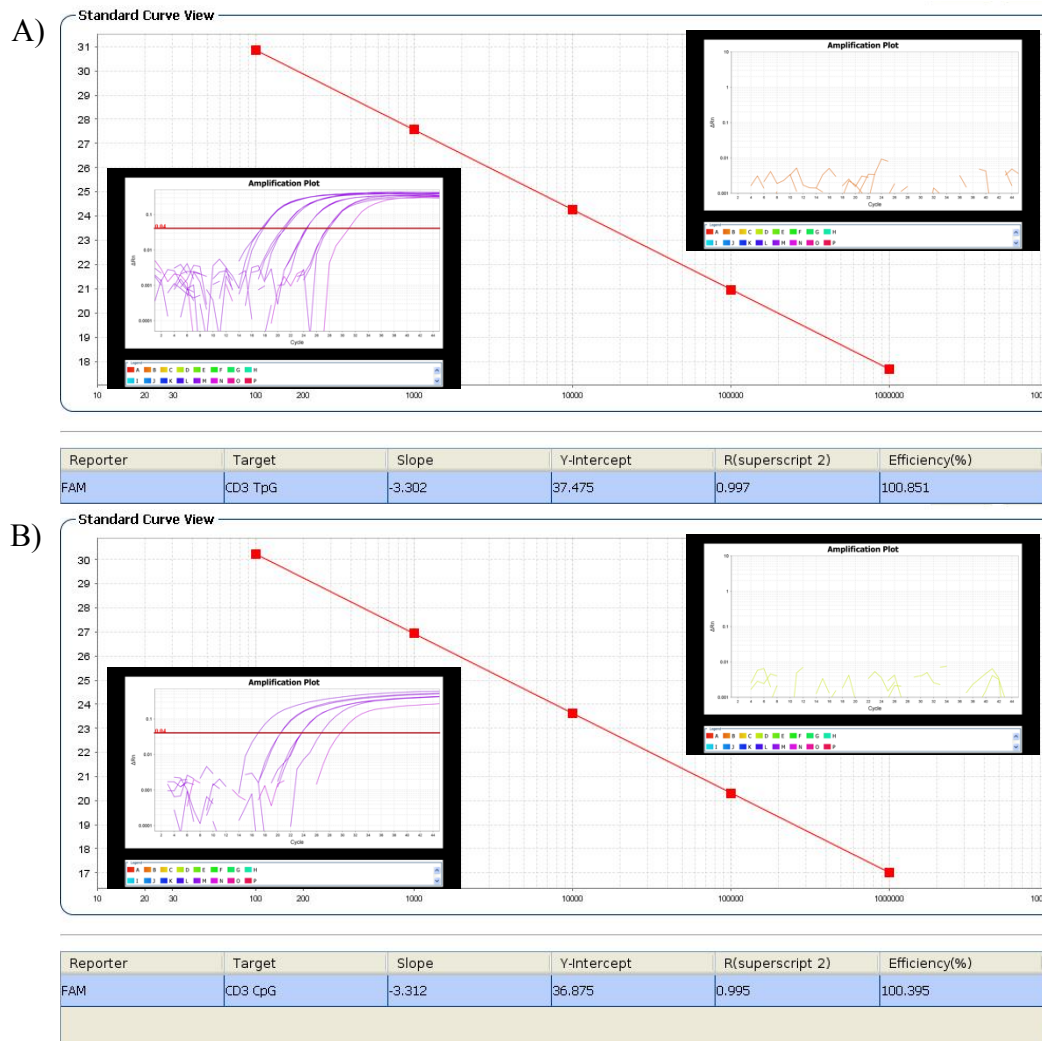
Sondid: TpG motiiv 27 bp ja CpG motiiv 18 bp

Praimerid

Joonis 8. CD3 erinevate ahelate (D, E ja G) paiknemise genoomne lokaliseerimine. Joonisel on kujutatud käesolevas töös *CD3D* geeni diferentsiaalse metülatsoonide hindamiseks kasutatud preamplifikatsiooni praimereid (helesinine) ja TpG/CpG variandi nukleotiidide järjestusi. Halliga on märgitud TpG/CpG motiivi qPCR produktid, vastavad praimerid on läbikriipsutatud ning punasega on tähistatud sondid. Lisaks on kollasega märgitud kõik antud regiooni jäävad TpG/CpG saidid. Tähtikesed tähistavad varasemas töös (Tserel *et al.*, 2015) uuritud metülatsoonisaite. Algne genoomi järjestus võetud UCSC andmebaasist⁵.

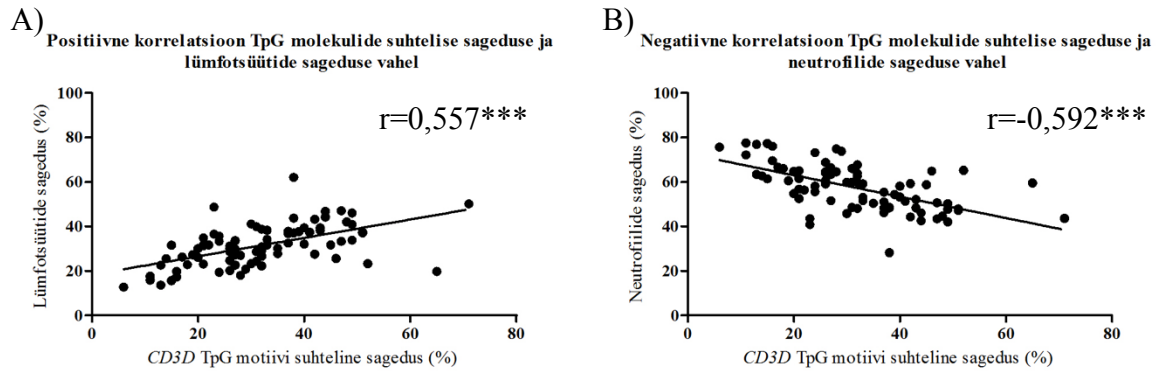
Kalibratsioonikurvi loomiseks konstrueeritud plasmiidide lahjendused näitasid lineaarset seost logaritmitud kontsentratsiooni ning nende keskmiste signaali tuvastavate C_T väärtuste vahel (joonis 9). Lisaks kinnitati praimerite spetsiifilisust TpG spetsiifilise motiivi ja TpG praimerite ning CpG spetsiifilise motiivi ja CpG praimerite vahel, kuna ei tuvastatud ristreaktsioone erinevate sihtmärkeregioonide ning praimerite korral (joonis 9).

⁵ <https://genome.ucsc.edu>



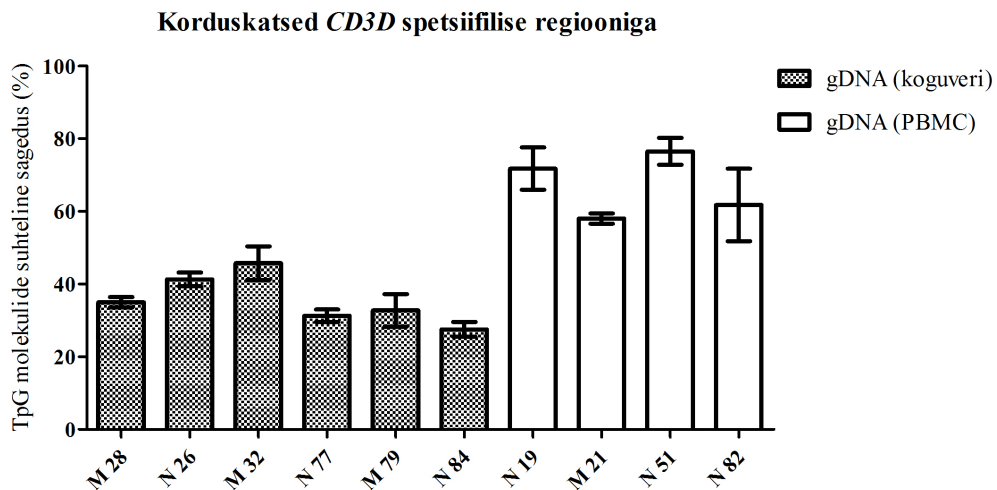
Joonis 9. Lineaarne seos *CD3D* diferentsiaalselt metüleeritud regiooni kalibratsioonikõvera jaoks konstrueeritud spetsiifiliste plasmiidide kontsentratsioonide (x-telg) ning qPCR-i poolt mõõdetud keskmiste C_T väärtuste (y-telg) vahel. Mida madalam on ahelreaktsioonis kasutatud plasmidi lahjenduse, vastavalt kas TpG (A) või CpG (B) variandi, kontsentratsioon, seda suuremad on C_T väärtused. Vasakul mustas kastis on illustreerivad näited qPCR-i originaalkõveratest. Selgelt väljendub, et 10x kontsentratsiooni muutus toob kaasa C_T väärtuse variatsiooni ± 3 tsükli võrra, mis on seotud optimaalse kalde (*slope*) väärtusega -3,3. Paremal asetsev musta raamiga graafik kinnitab sihtmärkeregiooni ja praimerite spetsiifilisust, kuna CpG praimerid ei anna TpG motiiviga produkti (A) ning vastupidi (B).

Järgnevad katsed viidi läbi 100 TÜ Eesti Geenivaramu geenidoonoriga. Pärast qPCR-i tulemuste esialgset analüüsi jäid uuringusse alles 83 indiviidi proovid (41 noort vs 42 vana; 40 meest vs 43 naist), kel kriteeriumiks seatud TpG või CpG spetsiifiliste replikaatide amplifikatsiooni C_T väärtuse SD ei ületanud 0,2. Koopiaarvud arvutati ViiA™ 7 tarkvara poolt ja nende põhjal leitud TpG suhtelist sagedust kõrvutati vererakkude põhipopulatsioonide sagedustega. Leiti positiivne korrelatsioon lümfotsüütide, kuid negatiivne korrelatsioon neutrofiilide osakaaluga (joonis 10).



Joonis 10. TpG koopiarvu sageduse tõus on seotud lümfotsüütide suurema (A), kuid neutrofiilide väiksema sagedusega veres (B). Graafikutel on kujutatud vastavaid lineaarseid seoseid, Pearsoni korrelatsioonikordajat r ning p -väärtusi: *** $p < 0,0001$.

Keskmine TpG motiivi osakaal PBMC-dest pärit gDNA-s on suurem kui täisverest eraldatud gDNA-s, vastavalt 67,0% ning 35,6%. Seda tõestasid kahel erineval ajahetkel läbiviidud bisulfit-töötlemise ja preamplifikatsiooni produktiga sooritatud 4 korduskatset. Tulemused on suhteliselt hästi replitseeritavad (joonis 11), kuna keskmine C_V erinevate proovidega korduskatsete korral oli 7,7% ($\pm 4,2\%$). Lisaks selgus, et *CD3D* demetülatatsioon on noortes kõrgem kui vanades, kuna katsed täisverest pärit gDNA-ga näitavad suuremat TpG % noortes indiviidides (40,7% vs 30,5%; joonis 11).



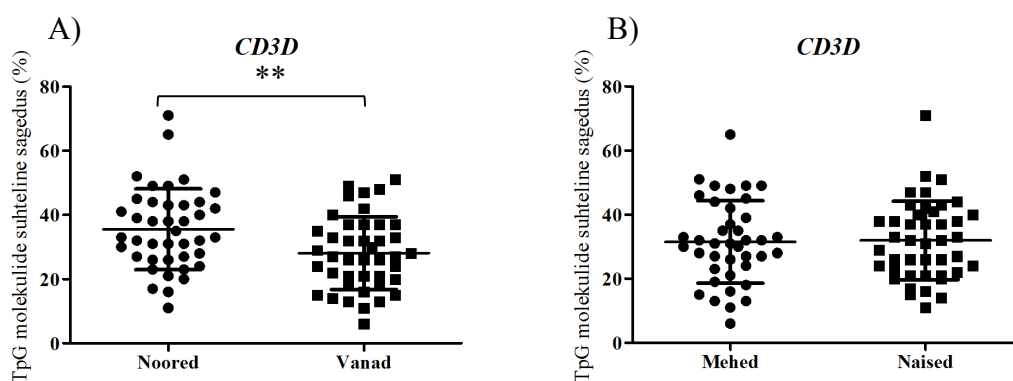
Joonis 11. TpG molekulide suhteline sagedus *CD3D* spetsiifilises regioonis. Graafikutel on visualiseeritud täisverest ning PBMC-dest pärit gDNA-ga läbiviidud nelja korduskatse keskmine TpG molekulide suhteline sagedus \pm SD. Erinevusi on märgata kasutatud materjali (täisveri vs PBMC) ning vanusest tuleneva varieeruvuse vahel gDNA-ga sooritatud katsete korral.

East sõltuvaid muutusi metülatsoonimustris näitavad ka geenidonoritega läbiviidud analüüsid. Kui keskmine TpG molekulide osakaal antud valimis oli 31,8%, siis vastavalt noortel

ja vanadel olid need näitajad statistiliselt oluliselt erinevad: vastavalt 35,5% ning 28,1%. Varieeruvust meeste ja naiste *CD3* metülatsoonis ei tuvastatud (tabel 3; joonis 12).

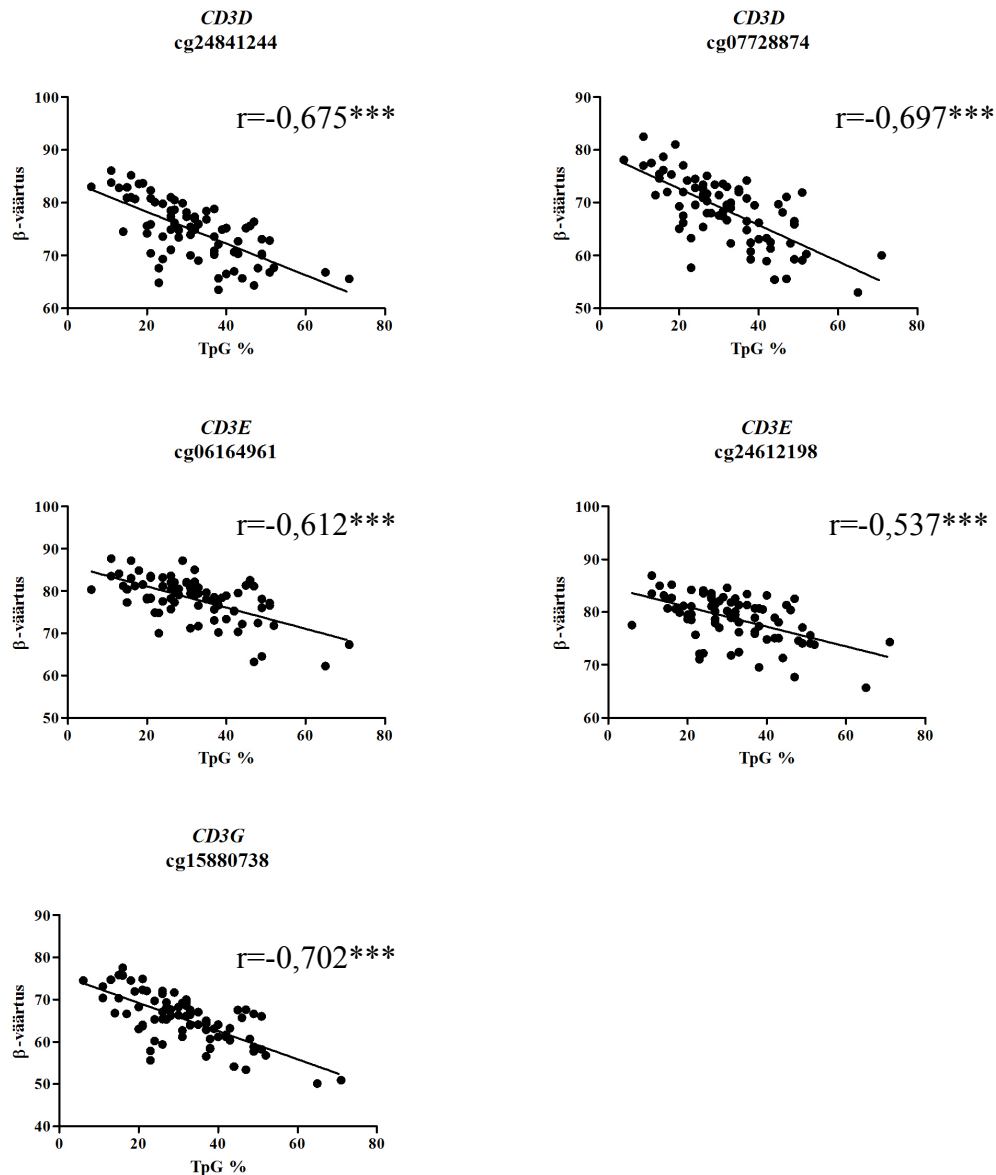
Tabel 3. *CD3D* diferentsiaalselt metüleeritud ala TpG molekulide suhtelised sagedused vastavates gruppides.

	N	TpG TpG + CpG
Kõik	83	31,8%
Noored	41	35,5%
Vanad	42	28,1%
Mehed	40	31,5%
Naised	43	32,0%



Joonis 12. *CD3D* spetsiifilise regiooni TpG molekulide suhtelise sageduse erinevus noorte ja vanade (A) ning meeste ja naiste vahel (B). Graafikutel on väljatoodud TpG motiivi suhtelise sageduse keskmine \pm SD ning p-väärtus: **p < 0,01.

Käesolevas töös saadud TpG motiivi suhtelist osakaalu kõrvutati varasemas töös tuvastatud *CD3* kodeerivates geenides paiknevate biomarkerite metülatsoonitasemega (Tserel *et al.*, 2015). Nii *CD3D* (cg24841244 ja cg07728874), *CD3E* (cg06164961 ja cg24612198) kui ka *CD3G* (cg15880738) markergeenide metülatsooni saitide β -väärtused (100% tähistab täielikku metüleeritust) korreleerusid negatiivselt antud uuringus tuvastatud TpG molekulide suhtelise osakaaluga (joonis 13). Nimetatud CpG saitide lokalisatsioon on tärnikestega tähistatud joonisel 8.

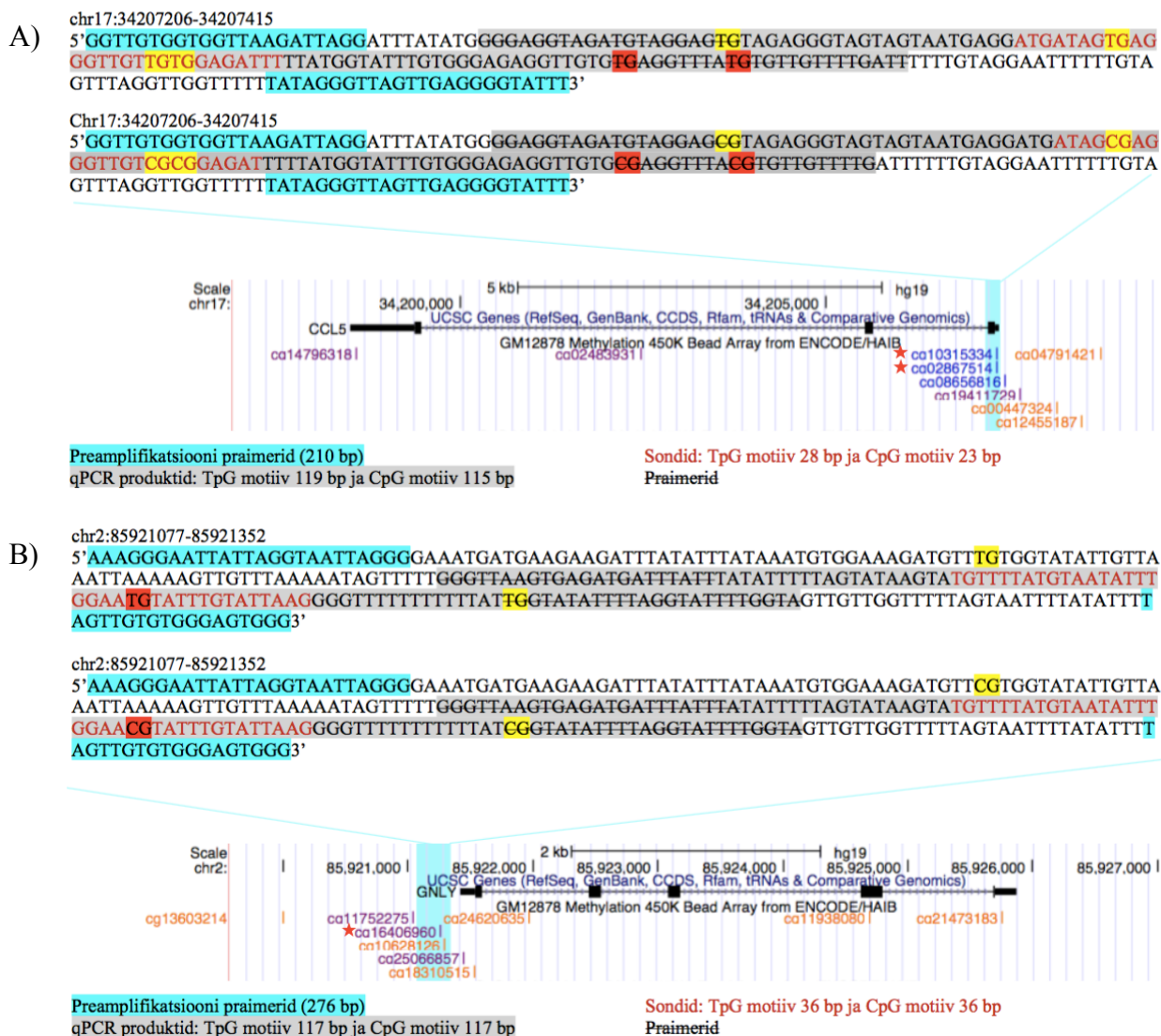


Joonis 13. Kõrgema β -väärtuse korral on CD3 kodeerivate geenide vastavas regioonis paikneva metülatsioonisaadi TpG motiivi sagedus madal. Graafikutel on kujutatud vastavaid lineaarseid seoseid, Pearsoni korrelatsioonikordajad r ning p -väärtusi: $***p < 0,0001$.

2.3.2. Metülatsiooni muutused vananemisega seotud geenides

Lisaks muutustele rakupopulatsioonide osakaaludes, on varasemad tööd tuvastanud vananemisega seotud metülatsioonimustreid ka rakupopulatsioonide sees. qPCR põhise meetodi väljatöötamiseks valiti välja 2 geeni: *CCL5* (selles asuvad CpG saidid cg10315334 ja cg02867514) ning *GNLY* (cg16406960), mis mõlemad on iseloomulikud põletikule ning mille metülatsioon oli vähenenud vanemates indiviidides võrreldes noortega (Tserel *et al.*, 2015). Kasutatud praimerid/sondid ning CpG saidid on toodud joonisel 14. Koopiaarvude kindlaks määramiseks konstrueeritud plasmiidid näitasid ka siin lineaarset seost ning optimaalset reaktsiooni efektiivsust (lisa 2). Preamplifikatsiooniks ning qPCR-ks vajalike praimerite

toimivust kinnitab läbiviidud harilik 45-tsükliline PCR (tulemused kajastamata) ning spetsiifilisust see, et ei toimunud ristreaktsioone erinevate sihtmärkjärjestuste ja praimerite vahel (lisa 2).



Joonis 14. *CCL5* (A) ja *GNLY* (B) genoomne lokalisatsioon. Joonisel on kujutatud käesolevas töös kasutatud põletikumarkerite *CCL5* ja *GNLY* diferentsiaalse metülatsiooni hindamiseks kasutatud preamplifikatsiooni primereid (helesinine) ja TpG/CpG variandi nukleotiidseid järjestusi. Halliga on märgitud on TpG/CpG motiivi qPCR produktid, vastavad praimerid on läbikriipsutatud ning punasega on tähistatud sondid. Lisaks on kollase ja punasega tähistatud kõik antud regiooni jäävad TpG/CpG saidid, kusjuures punasega märgitud CpG saitidest lähtuti antud regiooni metülatsioonimustri tuvastamiseks. Tärnikesed tähistavad varasemas töös (Tserel *et al.*, 2015) uuritud metülatsioonisaite. Algne genoomi järjestus võetud UCSC andmebaasist⁵.

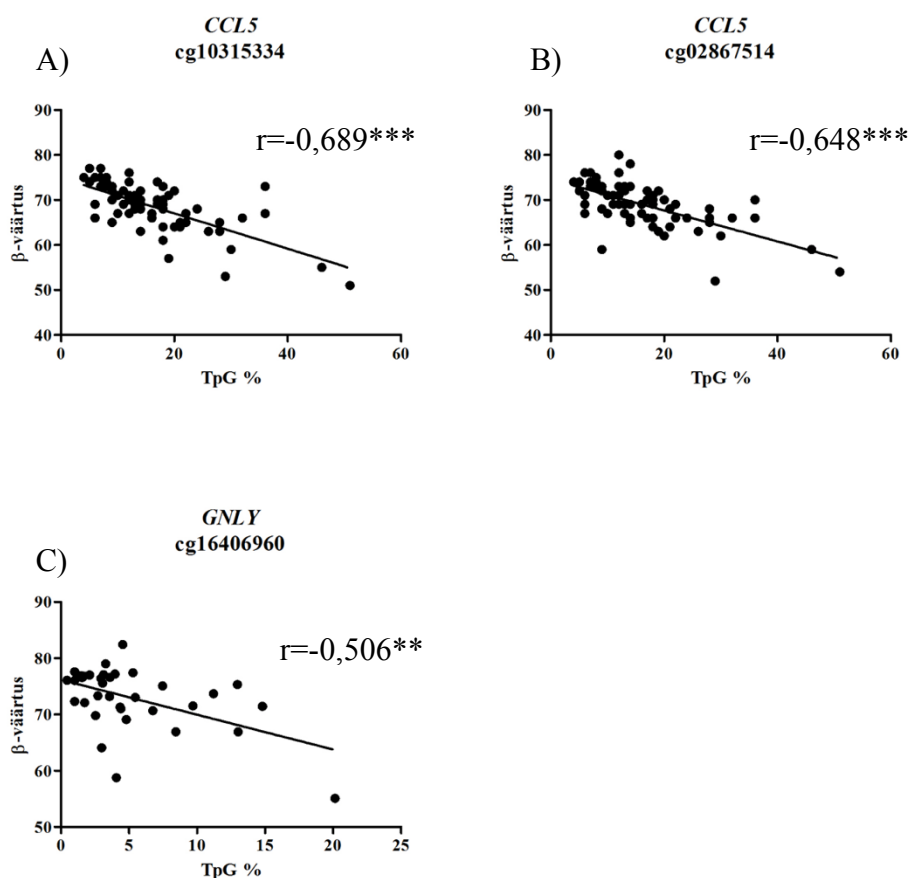
Algsest sajast katsesse kaasatud proovist jäi pärast qPCR-i esialgset tulemuste analüüsi alles 73 *CCL5* geeni spetsiifilist (39 noort vs 34 vana; 36 meest vs 37 naist) ning 39 *GNLY* geeni (18 noort vs 21 vana; 20 meest vs 19 naist) spetsiifilist proovi, kellel õnnestus määrata nii TpG kui ka CpG molekulide hulk, sest kriteeriumiks seatud lävitsükli SD ei ületanud 0,2. Sooritatud

analüüside kohaselt on *CCL5* keskmine TpG molekulide osakaal 16,6% ning *GNLY* 5,2% (tabel 4).

Tabel 4. *CCL5* ja *GNLY* metülatsoonimustri erinevusi kirjeldavate TpG molekulide suhtelised sagedused.

	N	$\frac{\text{CCL5 TpG}}{\text{TpG+CpG}}$	N	$\frac{\text{GNLY TpG}}{\text{TpG+CpG}}$
KÕIK	73	16,6%	39	5,2%
Noored	39	16,1%	18	4,2%
Vanad	34	17,1%	21	6,0%
Mehed	36	15,8%	20	5,2%
Naised	37	17,3%	19	5,2%

Soost ja vanusest sõltuvad erinevused on väikesed ning ka sooritatud kahepoolne paaritu t-test ei näidanud valitud biomarkerite puhul statistiliselt olulisi erinevusi noorte/vanade ning meeste/naiste vahel (lisa 3). Küll aga korreleerusid konkreetseks tööks valitud Tserel ja kolleegide poolt tuvastatud CpG saitide β -väärtused negatiivselt käesolevast uuringust saadud andmetega (joonis 15), kusjuures saadud seos oli statistiliselt oluline.



Joonis 15. Kõrgema β -väärtuse korral on *CCL5* või *GNLY* geeni vastavas regioonis paikneva metülatsoonisaidi TpG mustris sagedus madal. Graafikutel on kujutatud vastavaid lineaarseid seoseid, Pearsoni korrelatsioonikordajat r ning p -väärtusi: $p^{**} < 0,001$, $^{***}p < 0,0001$.

2.4. Arutelu

Antud töös arendatud TaqMan tehnoloogial põhinev meetod baseerub varasemalt läbiviidud uuringul, kus püüti metülatsioonimustri alusel kvantiseerida immuunsüsteemiga seotud rakke tervetel kontroll- ning vähkkasvajatega indiviididel. Tõestati, et loodud töövahend võimaldab rakke loendada vähemalt sama efektiivselt kui voolutsütomeeter (FACS). Erinevalt viimasest saab antud tehnoloogiaga paremini uurida lisaks verele ka tahkeid kudesid ning korduvkülmutatud materjali (Sehouli *et al.*, 2011). Käesolevas uuringus püüti Sehouli ja kolleegide töös kasutatud metoodikat kohandada lisaks rakupopulatsiooni kvantiseerimisele ka spetsiifiliste vananemisega seotud geenide diferentsiaalselt metüleeritud saitide metülatsioonitaseme hindamiseks. Kuna epigeneetilised muutused on püsivamad kui geeni ekspressioonitaseme kõikumised, võib diferentsiaalselt metüleeritud saitide hoolikas valik ning vastavate meetodite väljatöötamine viia oluliste biomarkerite tuvastamiseni, mis sobivad enneaegse vananemise ja *inflamm-aging* fenotüübi kirjeldamiseks.

Meetodi juurutamist alustati TCR kompleksi kuuluva koretseptori CD3 diferentsiaalselt metüleeritud regiooni uuringutega. CD3 on eksklusiivselt T-rakkude marker, mille ekspressioon on tugeva epigeneetilise kontrolli all. *CD3D* geeni vastav regioon on $CD4^+$ ja $CD8^+$ T-rakkudes peaaegu alati metüleerimata ehk peale bisulfit-töötlust ja amplifitseerimist TpG vormis (Sehouli *et al.*, 2011). Kuna on teada, et transkriptsiooniliste ja epigeneetiliste analüüside varieeruvus sõltub kasutatud materjalist ehk antud juhul vere rakulisest koosseisust, sest erinevusi kutsuvad esile nii T-, B- ja NK-rakud kui ka monotsüüdid ning granulotsüüdid (Jaffe & Irizarry, 2014; Reinius *et al.*, 2012), siis viidi *CD3D* regiooniga läbi võrdlevaid katseid. Põhianalüüdina kasutati täisvere gDNA-d, kuid lisaks sellele hinnati 4 eraldiseisva PBMC-dest pärit gDNA metülatsioonitaset. Oodatavalt tuvastati PBMC-des (T-rakud, B-rakud, NK rakud ning monotsüüdid) rohkem *CD3D* spetsiifilise regiooni TpG molekule (joonis 11) kui täisverest isoleeritud gDNA-s. Täisvere tuumaga rakkude hulgas on lisaks PBMC-dele ka neutrofiile, mis moodustavad umbes 40-80% täisvere valgete vererakkude mahust⁶ ja milles *CD3D* geeni vastav regioon on metüleeritud (Sehouli *et al.*, 2011), seega on loogiline, et TpG motiivi osakaal väheneb. Lisaks korreleerus *CD3D* regiooni TpG molekulide suhteline sagedus positiivselt lümfotsüütide, kuid negatiivselt neutrofiilide sagedusega (joonis 10). Leitud seos neutrofiilidega (suure sageduse korral esineb vere gDNA-s vähem *CD3D* regioonis tuvastatud TpG motiivi) on kooskõlas ealiste iseärasustega, kuna neutrofiilide osakaal vananenud,

⁶ <http://emedicine.medscape.com/article/2085133-overview>

põletikulises organismis suureneb (Summers *et al.*, 2010), samal ajal kui T-rakkude hulk väheneb (Linton & Dorshkind, 2004).

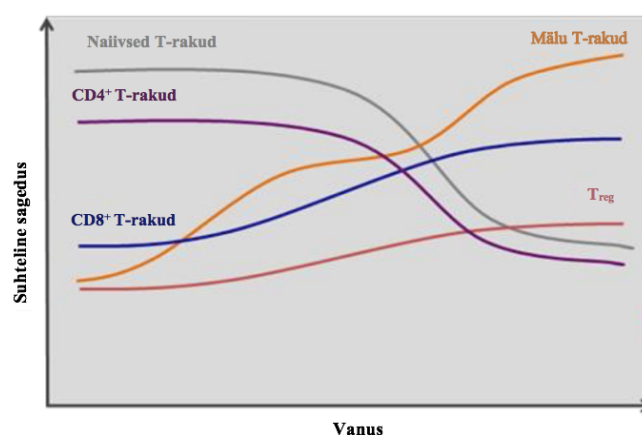
Geenidonorite gDNA-ga läbiviidud katsete tulemused andsid keskmiseks TpG motiivi sageduseks 31,3%, kusjuures noortes indiviidides tuvastati veidi enam demetüleeritud molekule kui vanades (vastavalt 35,5% ja 28,1%; joonis 12). Antud juhul viitab see samuti, et vananedes T-rakkude hulk väheneb ja seda kinnitab ka tuumuse involutsioonist põhjustatud T-rakkude defitsiit perifeerses veres, lümfisõlmedes ja luuüdis (Fagnoni *et al.*, 2000; Herndler-Brandstetter *et al.*, 2012; Lazuardi *et al.*, 2005). Lisaks olulisele ealisele iseärasusele valitud spetsiifilise *CD3D* piirkonna metülatsioonimustris, leiti korrelatsioon käesolevas töös saadud TpG motiivi suhtelist sageduse ja varasemas uuringus (Tserel *et al.*, 2015) tuvastatud CD3 kodeerivates geenides või nende läheduses paiknevate biomarkerite metülatsioonitasemega (joonis 13). Nii *CD3D* (cg24841244 ja cg07728874), *CD3E* (cg06164961 ja cg24612198) kui ka *CD3G* (cg15880738) markergeenide metülatsiooni saitide β -väärtused (100% tähistab täielikku metüleeritust) korreleerusid negatiivselt antud uuringus tuvastatud TpG suhtelise osakaaluga. Seos oli olemas hoolimata sellest, et nimetatud CpG saidid ei asu kõik samades geenides, ega paikne antud tööks valitud amplifikatsiooni piirkonnas. Näha võis väikest korrelatsioonikordaja vähenemist distantse suurenedes antud töös kasutatud sihtmärk regioonist, kuid siiski võib järeldada, et ühe retseptori alaühikuid kodeerivate järjestuste järjestuse metülatsiooni muutusi kirjeldavad regioonid on sarnase mustriga ja kõigi nende alusel võib hinnata T-rakkude osakaalu uuritavas materjalis.

Kui *CD3D* regiooniga sooritatud katsetest läbisid andmeanalüüsi 83 proovi, siis potentsiaalselt eaga seostuvate metülatsioonimustri muutusi kirjeldavate biomarkerite *CCL5* (selle CpG saitide cg10315334 ja cg02867514) ning *GNLY* (cg16406960) andmeanalüüs viidi vastavalt läbi 73 ning 39 prooviga, kus õnnestus määrata nii TpG kui ka CpG motiivide sagedus. Triplikaatidena sooritatud amplifikatsioon ei olnud stabiilne ja märkimisväärne hulk proove eemaldati, kuna kas TpG/CpG või mõlema motiivi tuvastamiseks saavutatud keskmine replikaatide C_T väärtuse SD ületas kriteeriumiks seatud 0,2. Alles jäänud proovide keskmine TpG molekulide osakaal täisveres oli *CCL5* geeni puhul 16,6% ning *GNLY* puhul 5,2%. Kuna neid gene ekspresseeritaks üksnes teatud vererakkudes (Conti *et al.*, 2001; Krensky, 2000) siis tulemus vastab oodatule.

Varasemalt on tuvastatud vanurite $CD8^+$ T-rakkudes valitud geenide GpG saitide langenud metülatsiooni ja tõusnud ekspressioonitaset (Tserel *et al.*, 2015), kusjuures peamiselt iseloomustabki vananenud organismi genoomi globaalne metülatsiooni vähenemine (Heyn *et*

al., 2012). Antud töös kasutatud põletiku markerite seost pigem *inflamm-aging* fenotüüpi omavate vanuritega ei leitud. *GNLY* geeni biomarkeri TpG motiivi sagedus vanurites oli küll veidi kõrgem, kuid selle statistilist olulisust ei tõestatud. Viimast võib aga põhjustada järelejäänud väike valim. Statistiliselt märkimisväärsed korrelatsioonid saadi TpG sageduse ja varasemast uuringust pärit *CCL5* ja *GNLY* CpG saitide (Tserel *et al.*, 2015) β -väärtuste vahel (joonis 15). Siit võib järeldada, et antud töövahendiga on küll võimalik tuvastada metülatsioonimustrit, kuid käesoleva uuringu tulemuste alusel east sõltuvaid järeldusi teha ei saa. Lisaks ei leitud uuritud saitide metülatsioonitasemetes erinevusi meeste ja naiste vahel, hoolimata sellest, et immuunsüsteemi vananemine sugude vahel varieerub (Marttila *et al.*, 2013).

Antud hetkel võib üksnes spekuloida põhjuste üle, miks loodud süsteem stabiilselt ei tööta. Kuna peamine osa katsetest viidi läbi täisvere gDNA-ga, siis on võimalik, et paremaid tulemusi saaks, kui rakke sortida või rakutüübi järgi normaliseerida. Üldjuhul on viimane vajalik, et tuvastada metüloomi muutusi ja korreleerida neid rakutüübi spetsiifiliste funktsioonidega, mida tõestavad katsed just $CD8^+$ rakkudega (Tserel *et al.*, 2015). *CCL5* ja *GNLY* geenides paiknevate biomarkeritega saadud tulemused võivad osutada mitteoluliseks just uuritava materjali tõttu. Samas on kinnitatud, et üldised metülatsiooni muutused siiski säilivad hoolimata vererakkude proportsioonide varieeruvusest (Tserel *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2015). Seega on täisvere gDNA analüüsimine loodud meetodiga keerukas protsess ja saadud tulemusi tuleb õigesti interpreteerida. Kindlasti tuleb arvestada eaga kaasneva T-rakkude alatüüpide ($CD4^+$ ja $CD8^+$) suhte muutuse (Wikby *et al.*, 1998) ning nende olekuga (naiivsed või mälu T-rakud). Kuna viimaste osakaal noortes ja vanades indiviidides varieerub, siis võib see seletada teatud osa metülatsiooni muutustest (joonis 16; Tserel *et al.*, 2015).



Joonis 16. Vanusest sõltuvad muutused T-raku alatüüpide suhtelises sagedustes. Kui $CD4^+$ T-rakkude hulk vanusega langeb, siis $CD8^+$ tõuseb. Sama trendi näitavad ka vastavalt naiivsed ning mälu T-rakud (Purnama *et al.*, 2013, kohandatud).

Kindel on see, et uuringuteks kasutatud metoodika on veel arenguprotsessis ja kuna loodav töövahend koosneb paljudest üksteisega seotud etappidest ja teguritest, siis võib iga varieeruvus lõpp-tulemile mõju avaldada. Esmane kriitiline punkt on markerite ehk sihtmärkgeenide ning neis paiknevate metülatsiooni muutusi kirjeldavate regioonide valik. Praktilise osa esimeses pooles keskenduti juba teadaolevale toimivale CD3 kodeeriva geeni regioonile, mis ei ole otsene põletiku marker. Antud töö teises osas uuriti põletikuvastuses osalevaid geene ning neis paiknevaid CpG saite, mille metülatsioon võiks potentsiaalselt noorel ja vanal varieeruda. Lähtuti kas kahest või ühest CpG saidist, kuid valik oleks võinud osutuda ka mõne muu kasuks, mille metülatsioonimuster on samuti varasemast (Tserel *et al.*, 2015) teada. Hetkel ei ole veel selge, millised võiksid täpselt olla need kõige paremad ja informatiivsed metülatsioonimustrit kirjeldavad piirkonnad, kuid nende väljaselgitamine võiks olla üks tuleviku perspektiive. Seejuures võib silmas pidada, et mida rohkem CpG saite valitud amplifikatsiooni piirkonda jääb, seda efektiivsem on metülatsiooni tuvastamine antud regioonis. Metülatsioonimuutusi kirjeldavaid regioone valides tuleb hinnata ka seda, kas piirkonda üldse on võimalik disainida praimereid, kuna mõne regiooni amplifitseerimine ongi keeruline, kui mitte võimatu.

Järgmisena etapina toimuv praimerite disain on kõige olulisemaks lähtepunktiks edaspidises praktilises töös. Kuna TaqMan qPCR eeldab amplifikatsiooniks sobivaid oligoid ning signaali tuvastamiseks olulist sondi, siis tagab see kõrgema spetsiifilisuse kui SYBR *Green* põhine qPCR. Lisaks sellele on võimalik tuvastada ka väiksemaid uuritava molekuli koopiaarve⁷. Ühe geeni metülatsioonimustri muutusi kirjeldava CpG saidi jaoks on tarvis luua kaks paari praimereid (*forward* ja *reverse*) ja kaks erinevat sondi, mis on vastavalt kas TpG või CpG motiivi spetsiifilised. Kusjuures selleks, et metülatsiooni üldse tuvastada, viiakse läbi bisulfit-töötlus. Andmete järgi peaks protseduuri efektiivsus olema >99%, mis tähendab, et edukalt võib eristada nii mittemetüleeritud kui ka metüleeritud tsütosiine⁸. Bisulfit-töötlus toimub vahetult enne preamplifikatsiooni etappi. Kuna konverteeritud DNA muutub fragmenteerituks, ahelatel puudub komplementaarsus ning mittemetüleeritud molekulid on kaotanud oma järjestusest tsütosiini, siis võib see langetada qPCR-i efektiivsust⁹.

Kvantitatiivse ahelreaktsiooni toimimist mõjutavad ka metülatsiooni spetsiifilised qPCR-i oligod. Nende disainimine on üsna väljakutsuv, sest tavalise 4 erineva nukleotiidi asemel (C, G, T, A) sisaldavad antud amplikonid suuremalt jaolt 3 erinevat lämmastikalust (G, T, A). Kuna

⁷ <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>

⁸ <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/56/d5001i.pdf>

⁹ <http://www.epibeat.com/tools-technology/bisulfite-conversion-and-methylation-sequencing/2131/>

metüleerimata variandis puudub üks pürimidiinidest, siis praimerite ning sondi konstrueerimisel võib tekkida probleeme optimaalse pikkuse ning sulamistemperatuuriga oligode loomisel. Lisaks tuleb arvestada, et huvipakkuvad CpG/TpG saidid peavad asuma regioonides, kuhu praimerid või sondid seonduvad, lokaliseerudes eelistatult nende 3' otsas¹⁰. Nii *CCL5* kui ka *GNLY* qPCR-i praimerid funktsioneerisid ja seda näitasid nii läbiviidud harilik PCR kui ka qPCR plasmiididega, kuna kalibratsioonikõverad omasid eeldatud lineaarset seost ning optimaalset efektiivsust mõlema geeni korral (lisa 2).

Vahetult enne reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni läbiviidav preamplifikatsioon, mis võimaldab vähendada qPCR-ks vajamineva proovi mahtu, vajab samuti primereid. Antud juhul aga ei tohi disainitavad oligod sisaldada metülatsioonimustri muutusi kirjeldavaid saite, kuna oluline on tagada qPCR-ks vajalik ühene järjestus nii TpG kui ka CpG spetsiifiliste praimerite tarbeks. Ka siin olid mõlema põletikku iseloomustava markergeeni praimerid efektiivsed, kuna amplifitseeriti vajaliku pikkusega PCR produkt. Küll aga on tegelikku preamplifikatsiooni efektiivsust ja saavutatud kontsentratsiooni raske kontrollida, kuna bisulfit-töödeldud DNA-d ei ole võimalik spektrofotomeetriga mõõta. See jätab võimaluse, et qPCR-i võetavad proovide kogused ei ole võrdsed ja võivad kaasnedas kõrvalkaldeid. Lisaks jääb alati šanss, et erinevad reagentid, mida preamplifikatsiooniks kasutatakse, võivad samuti reaalaja PCR-i mõjutada.

Tundlikum TaqMan tehnoloogial põhinev ahelreaktsioon on keerulisem just fluorestsents signaali eritava sondi kasutamise tõttu. Kuna viimase efektiivsust enne reaalaja PCR-i läbiviimist ei ole võimalik kinnitada, siis selle õige järjestuse loomine on oluline koht, mille ebaõnnestumine võib kaasa tuua just amplifikatsiooni kõverate varieeruvust esile kutsuvaid komplikatsioone. Antud juhul võivad ebakompetentsed sondid olla põhjuseks, miks *GNLY* metülatsiooni motiivide amplifikatsiooni kõveraid iseloomustab liiga kiire platoo saavutamine (lisa 2).

Epigeneetikal põhinevad analüüsid võivad tulevikus osutada väga heaks prognostiliseks vahendiks, mida on võimalik kergesti standardiseerida (Sehouli *et al.*, 2011). Eaga kaasnevate immuunsüsteemi muutuste hindamiseks loodud meetodika tööle saamine võimaldaks läbi viia immuunfenotüpiseerimist lähtuvalt täisvere gDNA metülatsioonist. Hetkel veel ebastabiilselt töötav meetodika vajab optimeerimist ning selle jaoks oleks hea läbi viia rohkem katseid, kaasata suuremal hulgal ning teistsuguseid sihtmärkgeene ja CpG regioone. Protseduuriks

¹⁰ <http://www.epibeat.com/tools-technology/bisulfite-conversion-and-methylation-sequencing/2131/>

kuluvad ressursid, nii ajalised kui materiaalsed, tuleks viia miinimumini. Näiteks aitaks, kui vähendada qPCR-ks vajamineva proovi kogust, kusjuures jättes välja ka preamplifikatsiooni etapi, mis kulutab aega, tõenäoliselt tekitab “taustmüra”, rääkimata sellest, et ebaefektiivne toimumine võib pärssida lõpptulemi saavutamist. Metoodika optimeerimise hulka võiks kuuluda ka täisvere gDNA kasutamine katsetes, kusjuures teades, et kasutatud materjal toimib vähemalt sama efektiivselt või isegi paremini kui näiteks PBMC-dest pärit gDNA. Kuna suures osas tänapäeval läbiviidavates kliinilistes uuringutes kasutatakse täisvere gDNA-d, siis oleks antud töövahendit väga hea rakendada kliiniliste uuringute rutiinses diagnostikas (Sehouli *et al.*, 2011). Veelgi enam, täiustatud ning optimeeritud tehnoloogiat oleks võimalik kasutada lisaks vananemist ennustavatele parameetritele tõenäoliselt ka muude katsete/uuringute läbiviimiseks.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö teoreetilises osas anti ülevaade immuunsüsteemist ja selle vananemisest. Iseloomustati üldiselt eaga kaasnevaid muutusi kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteemis. Kuna viimast mõjutab vanus rohkem, siis põhilist tähelepanu pöörati T-rakkudele ja nende geeniekspressioonile. Lisaks kirjeldati DNA metüleerimisest tingitud geeniekspressiooni regulatsiooni ning antud epigeneetilise mehhanismi potentsiaali biomarkerite tuvastamiseks. Kuna epigeneetilised muutused on püsivamad kui geeniekspressiooni kõikumised, siis on metülatsioonimuutusi kasutatud juba rakupopulatsioonide kvantiseerimiseks. Lähtuvalt sellest oli antud töö eesmärgiks TaqMan qPCR tehnoloogial põhineva meetodi väljatöötamine, et oleks võimalik määrata põletikku kirjeldavates geenides metülatsioonimuutusi. Spetsiifiliste biomarkerite leidmine võimaldaks prognoosida enneaegset vananemist.

Meetodi juurutamist alustati TCR kompleksi kuuluva CD3 kodeeriva geeni diferentsiaalselt metüleeritud regiooni uuringutega, kuna varasemalt on kinnitatud antud markeri toimivust. CD3 on T-rakke kirjeldav koretseptor ja selle ekspressioon on epigeneetilise kontrolli all. CD3 diferentsiaalselt metüleeritud regioon esineb T-rakkudes peale DNA bisulfit-töötlust põhiliselt TpG variandina ja muudes rakkudes CpG variandina. Saadud TpG ehk metüleerimata motiivi suhtelist sagedust korreleeriti indiviidide neutrofiilide ja lümfotsüütide osakaaluga veres, tuvastati vastavalt negatiivne ja positiivne korrelatsioon. Vanuse kasvades T-rakkude hulk väheneb, kuid neutrofiilide sagedus kasvab ja seetõttu saadud negatiivne korrelatsioon CD3 diferentsiaalselt metüleeritud regiooni TpG motiivi osakaalu ja neutrofiilide vahel on loogiline, positiivne korrelatsioon lümfotsüütidega vastab samuti oodatule. Lisaks võis antud regiooniga läbiviidud katsete tulemusena näha statistiliselt olulist erinevust noorte ja vanade vahel, kuna T-rakke kirjeldavate TpG molekulide osakaal oli vastavalt 35,5% ja 28,1%.

Töösse valitud metülatsioonimuutusi kirjeldavad regioonid võimaldasid edukalt tuvastada TpG molekulide suhtelist sagedust geenides *CD3D*, *CCL5* ja *GNLY*, kuna tulemused korreleerusid metülatsioonikiibi abil varem saadutega. Küll aga ei leitud east sõltuvaid muutusi *inflamm-aging* fenotüüpi kirjeldavate markergeenide *CCL5* ja *GNLY* metülatsioonitasemetes. Suure tõenäosusega jäi statistiliselt oluliste tulemuste saavutamine veel täielikult väljaarendamata tehnoloogia taha. Käesoleval hetkel töötab kasutatud mitmest üksteisega tihedalt seotud etapist koosnev meetod ebastabiilselt. Välja selekteeritud tulemused vähendasid valimi suurust ning seetõttu võis ka vanusega kaasnevate seoste loomine ebaõnnestuda. Lisaks võib mitteolulisi

tulemusi põhjustada ka katseteks valitud materjal ehk täisvere genoomne DNA, mida on raske analüüsida ja tulemuste interpreteerimine nõuab erinevate kriteeriumidega arvestamist.

Eaga kaasnevate immuunsüsteemi muutuste hindamine on keerukas protsess, kuid selle potentsiaaliks on prognoosida enneaegset vananemist ja seda esile kutsuvaid põhjuseid. Võib järeldada, et antud epigeneetikal põhineval analüüsimeetodil on tulevikus perspektiivi. Protsessis oleva tehnoloogia stabiilne ja efektiivne töövõime võib osutada väga heaks vahendiks kliinilises diagnostikas, millega uurida immuunsüsteemis toimuvaid east sõltuvaid muutusi. Lisaks on võimalus, et täiustatud ning optimeeritud metoodikat on võimalik rakendada ka muudes uuringutes, kui vastavaid katsetingimusi kohandada.

TaqMan technology based methylation pattern analysis to monitor premature immune system aging

Hanna Rein

SUMMARY

The immune system protects organisms from various harmful insults. The system itself is complex and its efficiency varies. The immune system is affected by age and aging is often related to decreased host defenses and chronic inflammation. Biomarkers for the prediction of premature aging could enable the application of preventive means. Since the epigenetic changes are more permanent than variations in gene expression levels, the method that would quantify changes in marker gene methylation can be with great potential. The purpose of this research was to start developing TaqMan technology based quantitative PCR for identifying methylation patterns of immune system related genes in order to find biomarkers for premature aging monitoring.

The first experiments were carried out with a differentially methylated region in the promotor of *CD3D* gene, since earlier researches have proven its functionality. CD3 is a T-cell marker and its expression is under the epigenetic control. *CD3D* differently methylated region appears mainly as TpG motive in T-cells (after bisulfite treatment of isolated DNA), however, in all other cells as CpG motive. The epigenetically measured frequency of T-cells was negatively correlated with relative frequencies of neutrophils and positively with lymphocytes. During aging the T-cell count decreases while neutrophil frequency increases. Indeed, we could reveal significant differences in TpG variant percentages between young and old individuals (35,5% and 28,1%, respectively).

The methylation level of *CCL5* and *GNLY* correlated well with data gained with Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina) during previous study. However, there were no statistically significant associations with age. It is highly possible that irrelevant results were caused by the unstability of the method used. The sample size was too small, because of filtering out samples with non-concordant replicates. In addition to this, the used sample (whole blood) may as well cause non significant results, because analyzing whole blood and interpreting the results is challenging.

Evaluating age dependent immune system changes is a complicated process, but it would be a helpful tool to predict premature aging and the factors that could cause of it. To conclude, epigenetic based analysis is promising in future perspective. Developing stable and effective tool may become very important technique for evaluating clinical parameters for investigating premature aging. It is also possible that an improved and standardized method can be used for other research purposes if the test conditions are adjusted.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin siiralt tänada oma juhendajat Kai Kisandit, kelle poole pöördudes sain alati vajalikku nõu ja näpunäiteid edasiseks tegutsemiseks. Lisaks suured tänusõnad ka Pärt Petersonile, kelle kasulikud soovitused ning juhtnöörid töö valmimisel olid suureks abiks. Aitäh ka kõigile teistele molekulaarpatoloogia töögrupi liikmetele, kes olid väga abivalmid ning toetavad.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ademokun, A., Wu, Y.-C., & Dunn-Walters, D. (2010). The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology*, 11(2), 125–37.
- Agrawal, A., Agrawal, S., & Gupta, S. (2007). Dendritic cells in human aging. *Experimental gerontology*, 42(5), 421–6.
- Almanzar, G., Schwaiger, S., Jenewein, B., Keller, M., Herndler-Brandstetter, D., Würzner, R., ... Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *Journal of virology*, 79(6), 3675–83.
- Arnold, C. R., Wolf, J., Brunner, S., Herndler-Brandstetter, D., & Grubeck-Loebenstein, B. (2011). Gain and loss of T cell subsets in old age--age-related reshaping of the T cell repertoire. *Journal of clinical immunology*, 31(2), 137–46.
- Austad, S. N. (2006). Why women live longer than men: Sex differences in longevity. *Gender Medicine*, 3(2), 79–92.
- Aydar, Y., Balogh, P., Tew, J. G., & Szakal, A. K. (2002). Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand-mediated repair of co-stimulation. *European journal of immunology*, 32(10), 2817–26.
- Azuma, M., Phillips, J. H., & Lanier, L. L. (1993). CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(4), 1147–59.
- Baylis, D., Bartlett, D. B., Patel, H. P., & Roberts, H. C. (2013). Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longevity & healthspan*, 2(1), 8.
- Bell, J. T., Tsai, P.-C., Yang, T.-P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., ... Deloukas, P. (2012). Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS genetics*, 8(4), e1002629.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J., & Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40(1), 91–9.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., Paffenbarger, R. S., Clark, D. G., Cooper, K. H., & Gibbons, L. W. (1989). Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA*, 262(17), 2395–401.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 6(8), 611–22.
- Bock, C., Paulsen, M., Tierling, S., Mikeska, T., Lengauer, T., & Walter, J. (2006). CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure. *PLoS genetics*, 2(3), e26.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J. S., Horvath, S., & Vilain, E. (2011). Epigenetic predictor of age. *PloS one*, 6(6), e14821.
- Boraschi, D., Aguado, M. T., Dutel, C., Goronzy, J., Louis, J., Grubeck-Loebenstein, B., ... Del Giudice, G. (2013). The gracefully aging immune system. *Science translational medicine*, 5(185), 185ps8.
- Borrego, F., Alonso, M. C., Galiani, M. D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., ... Solana, R. (1999). NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Experimental gerontology*, 34(2), 253–65.

- Breiling, A., & Lyko, F. (2015). Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics & Chromatin*, 8(1), 24.
- Brunner, S., Herndler-Brandstetter, D., Weinberger, B., & Grubeck-Loebenstien, B. (2011). Persistent viral infections and immune aging. *Ageing research reviews*, 10(3), 362–9.
- Brunnsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Hjelmberg, J. v B., Pedersen, B. K., & Jeune, B. (2003). Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *The American journal of medicine*, 115(4), 278–83.
- Cané, S., Ponnappan, S., & Ponnappan, U. (2012). Altered regulation of CXCR4 expression during aging contributes to increased CXCL12-dependent chemotactic migration of CD4(+) T cells. *Aging cell*, 11(4), 651–8.
- Cao, J.-N., Gollapudi, S., Sharman, E. H., Jia, Z., & Gupta, S. (2010). Age-related alterations of gene expression patterns in human CD8+ T cells. *Aging cell*, 9(1), 19–31.
- Chatta, G. S., Andrews, R. G., Rodger, E., Schrag, M., Hammond, W. P., & Dale, D. C. (1993). Hematopoietic progenitors and aging: alterations in granulocytic precursors and responsiveness to recombinant human G-CSF, GM-CSF, and IL-3. *Journal of gerontology*, 48(5), M207–12.
- Chen, G., Lustig, A., & Weng, N. ping. (2013). T cell aging: A review of the transcriptional changes determined from genome-wide analysis. *Frontiers in Immunology*, 4(MAY), 1–11.
- Chetty, R., & Gatter, K. (1994). CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *The Journal of pathology*, 173(4), 303–7.
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., ... Kelsey, K. T. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics*, 5(8), e1000602.
- Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Scialabba, G., Candore, G., Lio, D., ... Caruso, C. (2003). B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mechanisms of ageing and development*, 124(4), 389–93.
- Conti, P., Barbacane, R. C., Feliciani, C., & Reale, M. (2001). Expression and secretion of RANTES by human peripheral blood CD4+ cells are dependent on the presence of monocytes. *Annals of clinical and laboratory science*, 31(1), 75–84.
- Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W., & Arnheim, N. (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7370–4.
- Czesnikiewicz-Guzik, M., Lee, W.-W., Cui, D., Hiruma, Y., Lamar, D. L., Yang, Z.-Z., ... Goronzy, J. J. (2008). T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 127(1), 107–18.
- D'Aquila, P., Rose, G., Bellizzi, D., & Passarino, G. (2013). Epigenetics and aging. *Maturitas*, 74(2), 130–6.
- de Magalhães, J. P., Curado, J., & Church, G. M. (2009). Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(7), 875–81.
- De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., & Ginaldi, L. (2005). Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS letters*, 579(10), 2035–9.
- Ebert, L. M., Schaerli, P., & Moser, B. (2005). Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Molecular immunology*, 42(7), 799–809.

- Ershler, W. B., & Keller, E. T. (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual review of medicine*, 51, 245–70.
- Fagnoni, F. F., Vescovini, R., Passeri, G., Bologna, G., Pedrazzoni, M., Lavagetto, G., ... Sansoni, P. (2000). Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood*, 95(9), 2860–8.
- Fann, M., Chiu, W. K., Wood, W. H., Levine, B. L., Becker, K. G., & Weng, N.-P. (2005). Gene expression characteristics of CD28null memory phenotype CD8+ T cells and its implication in T-cell aging. *Immunological reviews*, 205, 190–206.
- Florath, I., Butterbach, K., Müller, H., Bewerunge-hudler, M., & Brenner, H. (2014). Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: An epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Human Molecular Genetics*, 23(5), 1186–1201.
- Flores, K. G., Li, J., Sempowski, G. D., Haynes, B. F., & Hale, L. P. (1999). Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *The Journal of clinical investigation*, 104(8), 1031–9.
- Fraga, M. F., & Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in genetics : TIG*, 23(8), 413–8.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254.
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69 Suppl 1, S4–9.
- Fraser, H. B., Khaitovich, P., Plotkin, J. B., Pääbo, S., & Eisen, M. B. (2005). Aging and gene expression in the primate brain. *PLoS biology*, 3(9), e274.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., ... Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827–31.
- Fülöp, T., Larbi, A., & Pawelec, G. (2013). Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in immunology*, 4, 271.
- Gao, H.-M., & Hong, J.-S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in immunology*, 29(8), 357–65.
- Gavazzi, G., & Krause, K.-H. (2002). Ageing and infection. *The Lancet. Infectious diseases*, 2(11), 659–66.
- George, A. J., & Ritter, M. A. (1996). Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunology today*, 17(6), 267–72.
- Gibson, K. L., Wu, Y.-C., Barnett, Y., Duggan, O., Vaughan, R., Kondeatis, E., ... Dunn-Walters, D. K. (2009). B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Aging cell*, 8(1), 18–25.
- Ginaldi, L., Di Benedetto, M. C., & De Martinis, M. (2005). Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immunity & ageing : I & A*, 2, 14.
- Goldman, A. S., & Prabhakar, B. S. (1996). Immunology Overview. University of Texas Medical Branch at Galveston.

- Gomez, C. R., Boehmer, E. D., & Kovacs, E. J. (2005). The aging innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 17(5), 457–462.
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2005). T cell development and receptor diversity during aging. *Current opinion in immunology*, 17(5), 468–75.
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2013). Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nature Immunology*, 14(5), 428–436.
- Griffith, A. V., Fallahi, M., Venables, T., & Petrie, H. T. (2012). Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth. *Aging cell*, 11(1), 169–77.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sadda, S., ... Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular cell*, 49(2), 359–67.
- Harries, L. W., Hernandez, D., Henley, W., Wood, A. R., Holly, A. C., Bradley-Smith, R. M., ... Melzer, D. (2011). Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging cell*, 10(5), 868–78.
- Hartsock, R. J., Smith, E. B., & Petty, C. S. (1965). Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. A study made from 177 cases of sudden death examined by necropsy. *American journal of clinical pathology*, 43, 326–31.
- Haynes, L., Eaton, S. M., Burns, E. M., Randall, T. D., & Swain, S. L. (2005). Newly generated CD4 T cells in aged animals do not exhibit age-related defects in response to antigen. *The Journal of experimental medicine*, 201(6), 845–51.
- Henson, S. M., Riddell, N. E., & Akbar, A. N. (2012). Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Current opinion in immunology*, 24(4), 476–81.
- Herndler-Brandstetter, D., Ishigame, H., & Flavell, R. A. (2013). How to define biomarkers of human t cell aging and immunocompetence? *Frontiers in Immunology*, 4(JUN), 2011–2014.
- Herndler-Brandstetter, D., Landgraf, K., Tzankov, A., Jenewein, B., Brunauer, R., Laschober, G. T., ... Grubeck-Loebenstien, B. (2012). The impact of aging on memory T cell phenotype and function in the human bone marrow. *Journal of leukocyte biology*, 91(2), 197–205.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., ... Esteller, M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10522–7.
- High, K. P. (2004). Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing research reviews*, 3(1), 1–14.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14(10), R115.
- Hunt, K. J., Walsh, B. M., Voegeli, D., & Roberts, H. C. (2010). Inflammation in aging part 2: implications for the health of older people and recommendations for nursing practice. *Biological research for nursing*, 11(3), 253–60.
- Jaffe, A. E., & Irizarry, R. A. (2014). Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biology*, 15(2), R31.
- Johnson, S. A., & Cambier, J. C. (2004). Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. *Arthritis Research & Therapy*, 6(4), 131–9.

- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 131.
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120(4), 437–47.
- Koch, C. M., & Wagner, W. (2011). Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging*, 3(10), 1018–27.
- Kohler, S., Wagner, U., Pierer, M., Kimmig, S., Oppmann, B., Möwes, B., ... Thiel, A. (2005). Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *European journal of immunology*, 35(6), 1987–94.
- Kolovou, G. D., Kolovou, V., & Mavrogeni, S. (2014). We are ageing. *BioMed research international*, 2014, 808307.
- Kovaiou, R. D., Weiskirchner, I., Keller, M., Pfister, G., Cioca, D. P., & Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *International immunology*, 17(10), 1359–66.
- Krensky, A. M. (2000). Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochemical pharmacology*, 59(4), 317–20. Salvestatud
- Krensky, A. M., & Ahn, Y.-T. (2007). Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nature clinical practice. Nephrology*, 3(3), 164–70.
- Lansdorp, P. M., Dragowska, W., Thomas, T. E., Little, M. T., & Mayani, H. (1994). Age-related decline in proliferative potential of purified stem cell candidates. *Blood cells*, 20(2-3), 376–80; discussion 380–1.
- Lazuardi, L., Herndler-Brandstetter, D., Brunner, S., Laschober, G. T., Lepperdinger, G., & Grubeck-Loebenstein, B. (2009). Microarray analysis reveals similarity between CD8+CD28- T cells from young and elderly persons, but not of CD8+CD28+ T cells. *Biogerontology*, 10(2), 191–202.
- Lazuardi, L., Jenewein, B., Wolf, A. M., Pfister, G., Tzankov, A., & Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology*, 114(1), 37–43.
- Linton, P. J., & Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature immunology*, 5(2), 133–9.
- Linton, P.-J., Li, S. P., Zhang, Y., Bautista, B., Huynh, Q., & Trinh, T. (2005). Intrinsic versus environmental influences on T-cell responses in aging. *Immunological reviews*, 205, 207–19.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–217.
- Lustig, A., Carter, A., Bertak, D., Enika, D., Vandanmagsar, B., Wood, W., ... Taub, D. D. (2009). Transcriptome analysis of murine thymocytes reveals age-associated changes in thymic gene expression. *International journal of medical sciences*, 6(1), 51–64.
- Marttila, S., Jylhävä, J., Nevalainen, T., Nykter, M., Jylhä, M., Hervonen, A., ... Hurme, M. (2013). Transcriptional analysis reveals gender-specific changes in the aging of the human immune system. *PloS one*, 8(6), e66229.
- Marttila, S., Kananen, L., Häyrynen, S., Jylhävä, J., Nevalainen, T., Hervonen, A., ... Hurme, M. (2015). Ageing-associated changes in the human DNA methylome: genomic locations and effects on gene expression. *BMC Genomics*, 16(1), 179.
- Meissner, C., & Ritz-Timme, S. (2010). Molecular pathology and age estimation. *Forensic science international*, 203(1-3), 34–43.

- Miller, J. P., & Allman, D. (2005, oktober). Linking age-related defects in B lymphopoiesis to the aging of hematopoietic stem cells. *Seminars in immunology*.
- Mirza, N., Pollock, K., Hoelzinger, D. B., Dominguez, A. L., & Lustgarten, J. (2011). Comparative kinetic analyses of gene profiles of naïve CD4+ and CD8+ T cells from young and old animals reveal novel age-related alterations. *Aging cell*, 10(5), 853–67.
- Miyaji, C., Watanabe, H., Toma, H., Akisaka, M., Tomiyama, K., Sato, Y., & Abo, T. (2000). Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Human immunology*, 61(9), 908–16.
- Mo, R., Chen, J., Han, Y., Bueno-Cannizares, C., Misek, D. E., Lescure, P. A., ... Yung, R. L. (2003). T cell chemokine receptor expression in aging. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(2), 895–904.
- Moskalev, A. A., Aliper, A. M., Smit-McBride, Z., Buzdin, A., & Zhavoronkov, A. (2014). Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(7), 1063–77.
- Nomellini, V., Gomez, C. R., & Kovacs, E. J. (2008). Aging and impairment of innate immunity. *Contributions to microbiology*, 15, 188–205.
- O'Mahony, L., Holland, J., Jackson, J., Feighery, C., Hennessy, T. P., & Mealy, K. (1998). Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clinical and experimental immunology*, 113(2), 213–9.
- Olek, A., Oswald, J., & Walter, J. (1996). A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic acids research*, 24(24), 5064–6.
- Olsson, J., Wikby, A., Johansson, B., Löfgren, S., Nilsson, B. O., & Ferguson, F. G. (2000). Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mechanisms of ageing and development*, 121(1-3), 187–201.
- Partridge, L. (2010). The new biology of ageing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1537), 147–54.
- Passtoors, W. M., Beekman, M., Deelen, J., van der Breggen, R., Maier, A. B., Guigas, B., ... Slagboom, P. E. (2013). Gene expression analysis of mTOR pathway: association with human longevity. *Aging cell*, 12(1), 24–31.
- Patterson, K., Molloy, L., Qu, W., & Clark, S. (2011). DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (56), e3170.
- Pawelec, G., Akbar, A., Beverley, P., Caruso, C., Derhovanessian, E., Fülöp, T., ... Wills, M. (2010a). Immunosenescence and Cytomegalovirus: where do we stand after a decade? *Immunity & ageing : I & A*, 7, 13.
- Pawelec, G., Akbar, A., Caruso, C., Solana, R., Grubeck-Loebenstein, B., & Wikby, A. (2005). Human immunosenescence: is it infectious? *Immunological reviews*, 205, 257–68.
- Pawelec, G., Larbi, A., & Derhovanessian, E. (2010b). Senescence of the human immune system. *Journal of comparative pathology*, 142 Suppl , S39–44.
- Pfister, G., & Savino, W. (2008). Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation*, 15(4-6), 351–64.
- Pfister, G., Weiskopf, D., Lazuardi, L., Kovaïou, R. D., Cioca, D. P., Keller, M., ... Grubeck-Loebenstein, B. (2006). Naïve T cells in the elderly: are they still there? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067, 152–7.

- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., & Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging cell*, 3(4), 161–7.
- Pollack, Y., Stein, R., Razin, A., & Cedar, H. (1980). Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6463–7.
- Purnama, C., Camous, X., & Larbi, A. (2013). An overview of T cell subsets and their potential use as markers of immunological ageing.
- Rakyan, V. K., Down, T. A., Maslau, S., Andrew, T., Yang, T.-P., Beyan, H., ... Spector, T. D. (2010). Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome research*, 20(4), 434–9.
- Reinius, L. E., Acevedo, N., Joerink, M., Pershagen, G., Dahlén, S.-E., Greco, D., ... Kere, J. (2012). Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PloS one*, 7(7), e41361.
- Remondini, D., Salvioli, S., Francesconi, M., Pierini, M., Mazzatti, D. J., Powell, J. R., ... Franceschi, C. (2010). Complex patterns of gene expression in human T cells during in vivo aging. *Molecular bioSystems*, 6(10), 1983–92.
- Rose, M. R., Flatt, T., Graves, J. L., Greer, L. F., Martinez, D. E., Matos, M., ... Shahrestani, P. (2012). What is Aging? *Frontiers in genetics*, 3, 134.
- Sansoni, P., Vescovini, R., Fagnoni, F., Biasini, C., Zanni, F., Zanlari, L., ... Passeri, M. (2008). The immune system in extreme longevity. *Experimental gerontology*, 43(2), 61–5.
- Saurwein-Teissl, M., Lung, T. L., Marx, F., Gschösser, C., Asch, E., Blasko, I., ... Grubeck-Loebenstein, B. (2002). Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(11), 5893–9.
- Sehouli, J., Loddenkemper, C., Cornu, T., Schwachula, T., Ho, U., Grützkau, A., ... Olek, S. (2011). Epigenetic quantification of tumor-infiltrating, 6(2), 236–246.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annual review of immunology*, 27, 591–619.
- Stein, R., Sciaky-Gallili, N., Razin, A., & Cedar, H. (1983). Pattern of methylation of two genes coding for housekeeping functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(9), 2422–6.
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., ... Cedar, H. (2009). Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature structural & molecular biology*, 16(5), 564–71.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*, 31(8), 318–24.
- Sun, Z., Asmann, Y. W., Kalari, K. R., Bot, B., Eckel-Passow, J. E., Baker, T. R., ... Thompson, E. A. (2011). Integrated analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing. *PloS one*, 6(2), e17490.
- Swain, S., Clise-Dwyer, K., & Haynes, L. (2005). Homeostasis and the age-associated defect of CD4 T cells. *Seminars in immunology*, 17(5), 370–7.
- Swift, M. E., Burns, A. L., Gray, K. L., & DiPietro, L. A. (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *The Journal of investigative dermatology*, 117(5), 1027–35.

- Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., Shen, H., ... Widschwendter, M. (2010). Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome research*, 20(4), 440–6.
- Troen, B. R. (2003). The biology of aging. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 70(1), 3–22.
- Tsaknaridis, L., Spencer, L., Culbertson, N., Hicks, K., LaTocha, D., Chou, Y. K., ... Vandenbark, A. A. (2003). Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *Journal of neuroscience research*, 74(2), 296–308.
- Tserel, L., Kolde, R., Limbach, M., Tretyakov, K., Kasela, S., Kisand, K., ... Peterson, P. (2015). Age-related profiling of DNA methylation in CD8+ T cells reveals changes in immune response and transcriptional regulator genes. *Scientific Reports*, 5(August), 13107.
- Utsuyama, M., Varga, Z., Fukami, K., Homma, Y., Takenawa, T., & Hirokawa, K. (1993). Influence of age on the signal transduction of T cells in mice. *International immunology*, 5(9), 1177–82.
- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., & Lansdorp, P. M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9857–60.
- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., ... Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome biology*, 15(2), R24.
- Weiskopf, D., Weinberger, B., & Grubeck-Loebenstien, B. (2009). The aging of the immune system. *Transplant International*, 22(11), 1041–1050.
- Weksler, M. E., & Szabo, P. (2000). The effect of age on the B-cell repertoire. *Journal of clinical immunology*, 20(4), 240–9.
- Weng, N. ping. (2006). Aging of the Immune System: How Much Can the Adaptive Immune System Adapt? *Immunity*, 24(5), 495–499.
- Wenisch, C., Patruta, S., Daxböck, F., Krause, R., & Hörl, W. (2000). Effect of age on human neutrophil function. *Journal of leukocyte biology*, 67(1), 40–5.
- Whisler, R. L., Newhouse, Y. G., & Bagenstose, S. E. (1996). Age-related reductions in the activation of mitogen-activated protein kinases p44mapk/ERK1 and p42mapk/ERK2 in human T cells stimulated via ligation of the T cell receptor complex. *Cellular immunology*, 168(2), 201–10.
- Wieczorek, G., Asemisen, A., Model, F., Turbachova, I., Floess, S., Liebenberg, V., ... Olek, S. (2009). Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Research*, 69(2), 599–608.
- Wigler, M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. *Cell*, 24(1), 33–40.
- Wikby, A., Månsson, I. A., Johansson, B., Strindhall, J., & Nilsson, S. E. (2008). The immune risk profile is associated with age and gender: Findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age. *Biogerontology*, 9(5), 299–308.
- Wikby, A., Maxson, P., Olsson, J., Johansson, B., & Ferguson, F. G. (1998). Changes in CD8 and CD4 lymphocyte subsets, T cell proliferation responses and non-survival in the very old: the Swedish longitudinal OCTO-immune study. *Mechanisms of Ageing and Development*, 102(2-3), 187–198.

- Yang, X., Stedra, J., & Cerny, J. (1996). Relative contribution of T and B cells to hypermutation and selection of the antibody repertoire in germinal centers of aged mice. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 959–70.
- Yuan, T., Jiao, Y., de Jong, S., Ophoff, R. A., Beck, S., & Teschendorff, A. E. (2015). An integrative multi-scale analysis of the dynamic DNA methylation landscape in aging. *PLoS genetics*, 11(2), e1004996.
- Yung, R. L., & Mo, R. (2003). Aging is associated with increased human T cell CC chemokine receptor gene expression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 23(10), 575–82.
- Zahn, J. M., Poosala, S., Owen, A. B., Ingram, D. K., Lustig, A., Carter, A., ... Becker, K. G. (2007). AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS genetics*, 3(11), e201.
- Zampieri, M., Ciccarone, F., Calabrese, R., Franceschi, C., Bürkle, A., & Caiafa, P. (2015). Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 151, 60–70.
- Zanni, F., Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F., Zanlari, L., Telera, A., ... Sansoni, P. (2003). Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Experimental gerontology*, 38(9), 981–7.
- Zubakov, D., Liu, F., van Zelm, M. C., Vermeulen, J., Oostra, B. A., van Duijn, C. M., ... Langerak, A. W. (2010). Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Current Biology : CB*, 20(22), R970–1.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

¹ http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html

(KASUTATUD: 27.05.2016)

² <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html> (KASUTATUD: 27.05.2016)

³ https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf (KASUTATUD: 27.05.2016)

⁴ <http://www.epibeat.com/tools-technology/bisulfite-conversion-and-methylation-sequencing/2131/> (KASUTATUD: 27.05.2016)

⁵ <https://genome.ucsc.edu> (KASUTATUD: 27.05.2016)

⁶ <http://emedicine.medscape.com/article/2085133-overview> (KASUTATUD: 27.05.2016)

⁷ <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html> (KASUTATUD: 27.05.2016)

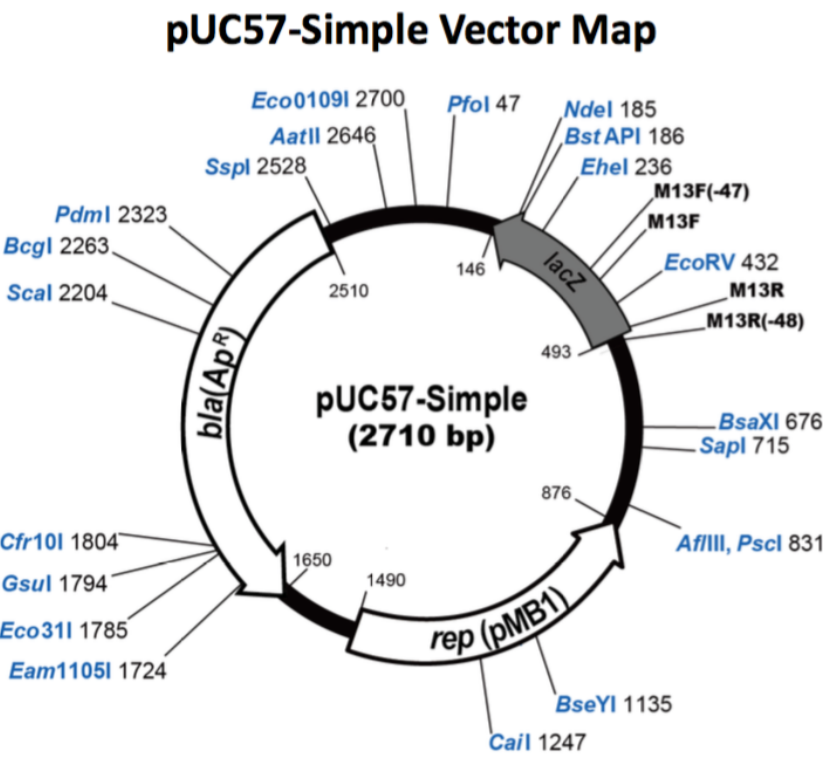
⁸ <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/56/d5001i.pdf> (KASUTATUD: 27.05.2016)

⁹ <http://www.epibeat.com/tools-technology/bisulfite-conversion-and-methylation-sequencing/2131/> (KASUTATUD: 27.05.2016)

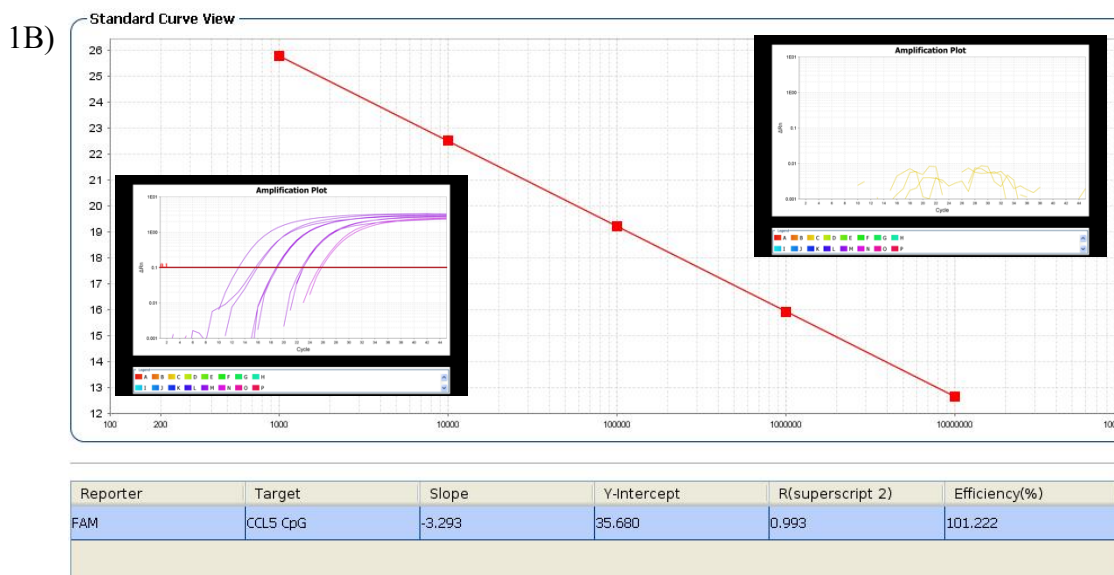
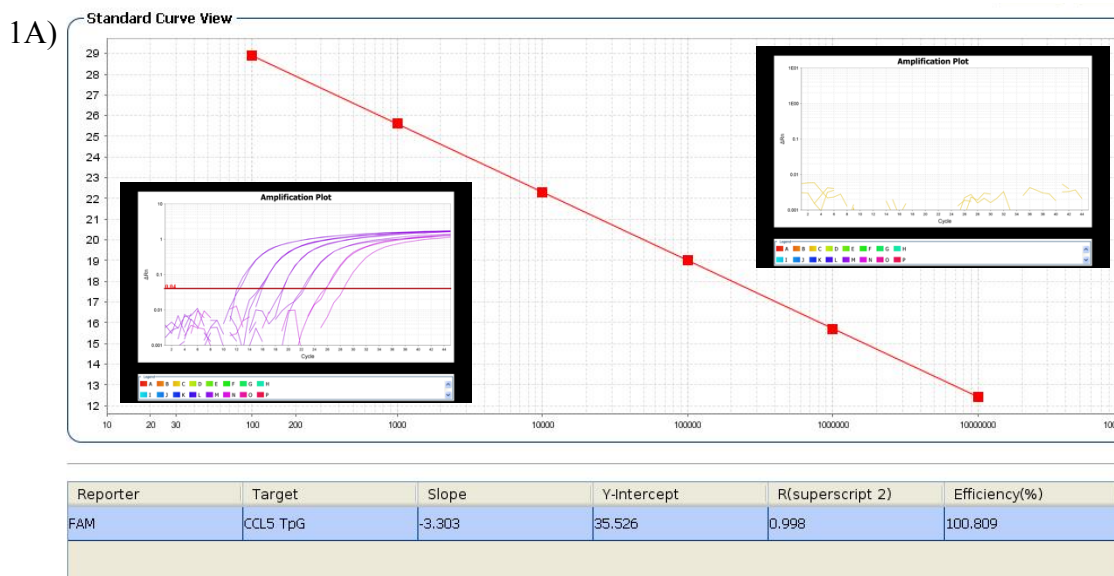
¹⁰ <http://www.epibeat.com/tools-technology/bisulfite-conversion-and-methylation-sequencing/2131/> (KASUTATUD: 27.05.2016)

LISAD

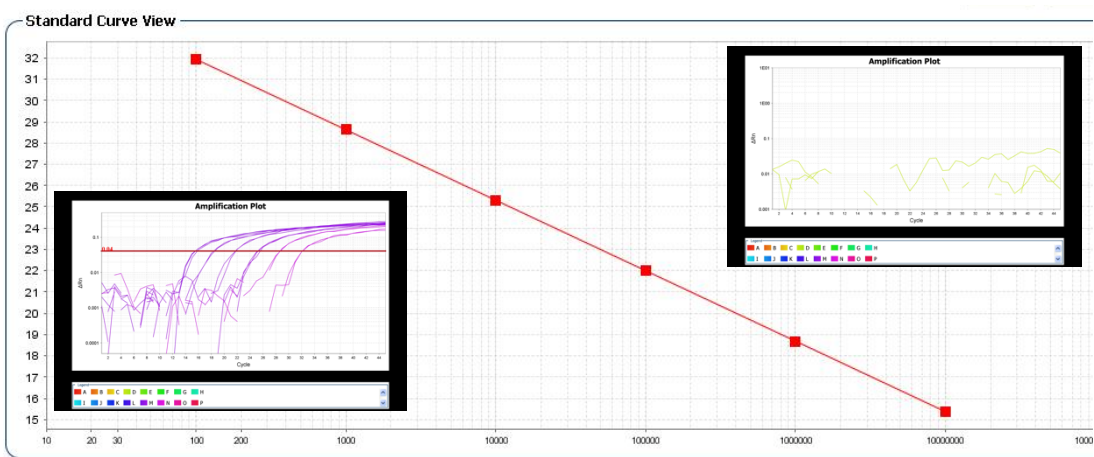
Lisa 1. Kloneerimisvektor pUC57-Amp.



Lisa 2. Lineaarne seos kalibratsioonikõvera jaoks konstrueeritud spetsiifiliste *CCL5* (1) ja *GNLY* (2) plasmidide kontsentratsioonide (x-telg) ning qPCR-i poolt mõõdetud keskmiste C_T väärtuste (y-telg) vahel. Mida madalam on ahelreaktsioonis kasutatud plasmidi lahjenduse, vastavalt kas TpG (1A, 2A) või CpG (1B, 2B) variandi, kontsentratsioon, seda suuremad on C_T väärtused. Mustas kastis on illustreerivad näided qPCR-i originaalkõveratest. Selgelt väljendub, et 10x kontsentratsiooni muutus toob kaasa C_T väärtuse varieeruvuse ± 3 tsükli võrra, mis on seotud optimaalse kalde (*slope*) väärtusega -3,3. Paremal asetsev musta raamiga graafik kinnitab sihtmärkregiooni ja praimerite spetsiifilisust, kuna CpG praimerid ei anna TpG motiiviga produkti (1A, 2A) ning vastupidi (1B, 2B).

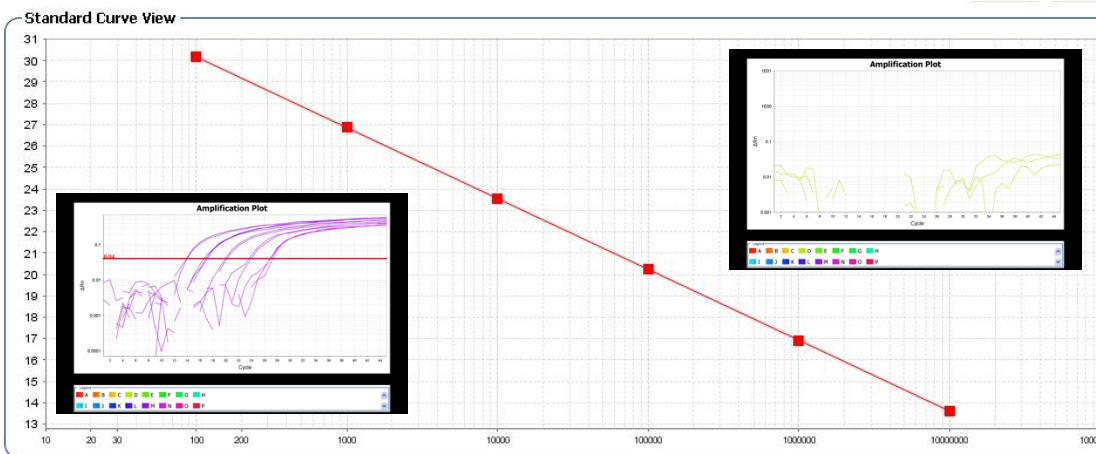


2A)



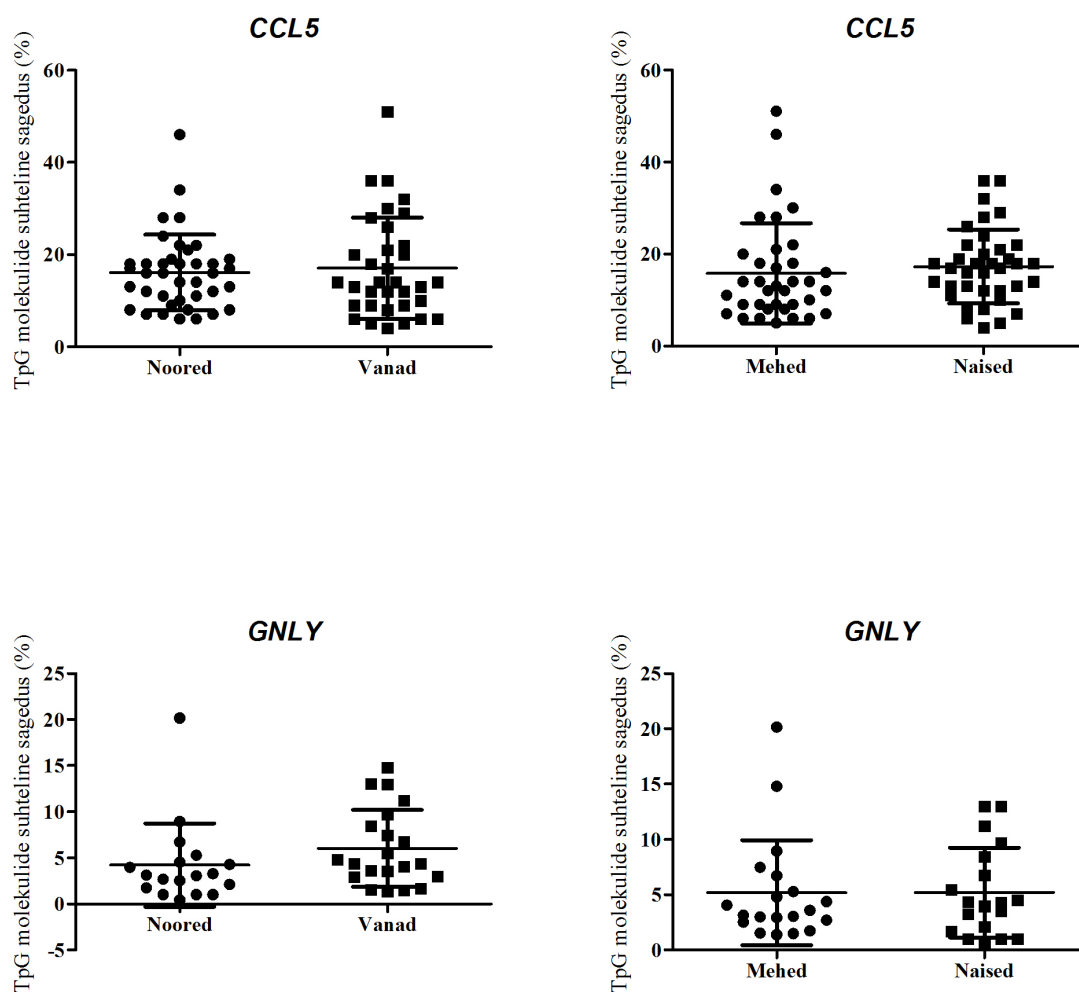
Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	GNLY TpG	-3.321	38.599	0.998	100.055

2B)



Reporter	Target	Slope	Y-Intercept	R(superscript 2)	Efficiency(%)
FAM	GNLY CpG	-3.322	36.843	0.998	100.014

Lisa 3. Läbiviidud kahepoolne paaritu t-test ei näita statistiliselt olulisi erinevusi geenides *CCL5* ja *GNLY* paiknevate biomarkerite metülatsoonimustrites ei noorte/vanade ega meeste/naiste vahel. Graafikutel on väljatoodud TpG motiivi suhtelise sageduse keskmine \pm SD.



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hanna Rein
(sünnikuupäev: 03.06.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

TaqMan tehnoloogia põhine metülatsioonimustri tuvastamine enneaegselt vananeva
immuunsüsteemi monitoorimiseks,

mille juhendajad on Kai Kisand, PhD ja Lili Milani, PhD

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2015